

BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2003-514224

(P2003-514224A)

(43)公表日 平成15年4月15日 (2003.4.15)

| (51)Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テ-マート (参考) |
|--------------------------|------|--------------|-------------|
| G 01 N 21/27 | | G 01 N 21/27 | C 2 G 0 5 7 |
| C 12 M 1/00 | | C 12 M 1/00 | A 2 G 0 5 9 |
| C 12 N 15/09 | | C 12 Q 1/68 | A 4 B 0 2 4 |
| C 12 Q 1/68 | | G 01 N 21/03 | Z 4 B 0 2 9 |
| G 01 N 21/03 | | 21/33 | 4 B 0 6 3 |

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 76 頁) 最終頁に続く

| | |
|--------------|-----------------------------|
| (21)出願番号 | 特願2001-536562(P2001-536562) |
| (86) (22)出願日 | 平成12年11月13日 (2000.11.13) |
| (85)翻訳文提出日 | 平成14年5月13日 (2002.5.13) |
| (86)国際出願番号 | P C T / U S 0 0 / 4 2 1 3 9 |
| (87)国際公開番号 | W O 0 1 / 0 3 5 0 8 1 |
| (87)国際公開日 | 平成13年5月17日 (2001.5.17) |
| (31)優先権主張番号 | 6 0 / 1 6 5, 0 7 5 |
| (32)優先日 | 平成11年11月12日 (1999.11.12) |
| (33)優先権主張国 | 米国 (U S) |
| (31)優先権主張番号 | 6 0 / 1 7 0, 6 8 2 |
| (32)優先日 | 平成11年12月14日 (1999.12.14) |
| (33)優先権主張国 | 米国 (U S) |

| | |
|---------|---|
| (71)出願人 | サーロメッド・インコーポレーテッド アメリカ合衆国カリフォルニア州94043, マウンテン・ビュー, ガルシア・アベニュー - 2375 |
| (72)発明者 | ナタン, マイケル・ジェイ アメリカ合衆国カリフォルニア州94024, ロス・アルトス, カーサ・ボニータ・コート 726 |
| (72)発明者 | ペナ, デビッド・ジェイ アメリカ合衆国ペンシルバニア州16801, ステイト・カレッジ, サウス・スパーク ス・ストリート 124 |
| (74)代理人 | 弁理士 社本 一夫 (外4名) 最終頁に続く |

(54)【発明の名称】 表面プラズモン共鳴を使用するバイオセンシング

(57)【要約】

本発明は表面プラズモン共鳴 (S P R) に基づいた検出アッセイ促進のための方法および試薬を提供する。本方法および試薬は団形支持体を使用する任意の分子認識アッセイで使用できる。本発明はまた、イメージング様式で働くS P R装置も提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 多数の空間的に分離した微容量ウェルから成るマイクロウェルアレイ、ここで該アレイはP D M S から成っている。

【請求項2】 10から200の間のウェルから成る請求項1に記載のマイクロウェルアレイ。

【請求項3】 該アレイが該多数のウェルの底表面として働く薄い金属フィルムを付隨する請求項1に記載のマイクロウェルアレイ。

【請求項4】 該薄い金属フィルムが表面プラズモン共鳴活性金属である請求項3に記載のマイクロウェルアレイ。

【請求項5】 該薄い金属フィルムがAu、Ag、AlおよびCuから成る群より選択される請求項4に記載のマイクロウェルアレイ。

【請求項6】 該薄い金属フィルムでガラス表面上が被覆されている請求項3に記載のマイクロウェルアレイ。

【請求項7】 表面の空間的に分離した領域上に多数の試薬を付隨させる方法であつて：

表面上にマイクロウェルアレイ鋳型を提供し、ここで該マイクロウェルアレイはP D M S から成り、およびここでアレイは多数の空間的に分離したウェルを提供しおよび各々のウェルの底は該表面の領域である；

表面を付隨する該ウェル内へ試薬を導入し；および
該鋳型を除去することから成っている方法。

【請求項8】 該表面が薄い金属フィルムである請求項7に記載の方法。

【請求項9】 該薄い金属フィルムが表面プラズモン共鳴活性金属である請求項8に記載の方法。

【請求項10】 該薄い金属フィルムがAu、Ag、AlおよびCuから成る群より選択される請求項9に記載の方法。

【請求項11】 該薄い金属フィルムでガラス表面上が被覆されている請求項8に記載の方法。

【請求項12】 検体を含んでいるであろう試験溶液中の該検体に対するアッセイを実施する方法であつて：表面プラズモン共鳴活性表面を提供し；分子を

該表面と付随させ、ここで該分子はコロイド状金属ナノ粒子を付隨している；
該表面と該試験溶液を接触させ、ここで該検体の存在または不在は、表面および該ナノ粒子間の相対的距離を変化させる；および
S P R プロフィールを測定することにより該距離を検出することから成っている方法。

【請求項13】 該表面プラズモン共鳴活性表面が薄い金属フィルムである請求項12に記載の方法。

【請求項14】 該薄い金属フィルムがAu、Ag、AlおよびCuから成る群より選択される請求項13に記載の方法。

【請求項15】 該薄い金属フィルムでガラス表面上が被覆されている請求項13に記載の方法。

【請求項16】 該コロイド状金属ナノ粒子がAu、Ag、AlおよびCuから成る群より選択される金属から成る請求項12に記載の方法。

【請求項17】 該コロイド状金属ナノ粒子が実質的に球形である請求項12に記載の方法。

【請求項18】 該コロイド状金属ナノ粒子が1nmから150nmの直径である請求項17に記載の方法。

【請求項19】 検体を含んでいるであろう試験溶液中の多数の該検体に対する多数のアッセイを実施する方法であって：

表面プラズモン共鳴活性表面を提供し；該検体に対する多数のリガンドを該表面へ付隨させ；

該表面と該試験溶液を接触させ、ここで検体の存在または不在は、該表面にまたは近傍に特定の型のリガンドを付隨している、特定の型のコロイド状金属ナノ粒子生じる；および

S P R プロフィールを測定することにより該特定の型のリガンドと該特定の型のコロイド状金属ナノ粒子間の該付隨を決定する、ここでS P R プロフィールは異なった型のコロイド状金属ナノ粒子間で区別可能である、ことから成っている方法。

【請求項20】 コロイド状金属ナノ粒子の型がそれらのサイズにより区別

される請求項19に記載の方法。

【請求項21】 コロイド状金属ナノ粒子の型がそれらの組成により区別される請求項19に記載の方法。

【請求項22】 該表面プラズモン共鳴活性表面が薄い金属フィルムである請求項19に記載の方法。

【請求項23】 該薄い金属フィルムがAu、Ag、AlおよびCuから成る群より選択される請求項22に記載の方法。

【請求項24】 該薄い金属フィルムでガラス表面上が被覆されている請求項22に記載の方法。

【請求項25】 該コロイド状金属ナノ粒子がAu、Ag、AlおよびCuから成る群より選択される金属から成る請求項19に記載の方法。

【請求項26】 該コロイド状金属ナノ粒子が実質的に球形である請求項19に記載の方法。

【請求項27】 該コロイド状金属ナノ粒子が1nmから150nmの直径である請求項26に記載の方法。

【請求項28】 検体を含んでいるであろう試験溶液中の該検体に対するアッセイを実施する方法であって：

表面プラズモン共鳴活性表面を提供し；

該アッセイを該表面でまたは近傍で実施し、ここでコロイド状金属ナノ粒子の存在または不在は、該試験溶液中の該検体の存在または不在を示し；

干渉計SPRで該表面のSPRプロフィールを測定することにより該ナノ粒子の該存在または不在を検出することから成っている方法。

【請求項29】 該表面プラズモン共鳴活性表面が薄い金属フィルムである請求項28に記載の方法。

【請求項30】 該薄い金属フィルムがAu、Ag、AlおよびCuから成る群より選択される請求項29に記載の方法。

【請求項31】 該薄い金属フィルムでガラス表面上が被覆されている請求項29に記載の方法。

【請求項32】 該コロイド状金属ナノ粒子がAu、Ag、AlおよびCu

から成る群より選択される金属から成る請求項28に記載の方法。

【請求項33】 該コロイド状金属ナノ粒子が実質的に球形である請求項28に記載の方法。

【請求項34】 該コロイド状金属ナノ粒子が1nmから150nmの直径である請求項33に記載の方法。

【請求項35】 検体を含んでいるであろう試験溶液中の該検体に対するアッセイを実施する方法であって：

表面プラズモン共鳴活性表面を提供し；

該アッセイを該表面でまたは近傍で実施し、ここでコロイド状金属ナノ粒子の存在または不在は、該溶液中の該検体の存在または不在を示し；およびここで該コロイド状金属ナノ粒子はAuS/Au殻粒子から成っている；および

該表面のSPRプロフィールを測定することにより該ナノ粒子の該存在または不在を検出することから成っている方法。

【請求項36】 該表面プラズモン共鳴活性表面が薄い金属フィルムである請求項35に記載の方法。

【請求項37】 該薄い金属フィルムがAu、Ag、AlおよびCuから成る群より選択される請求項36に記載の方法。

【請求項38】 該薄い金属フィルムでガラス表面上が被覆されている請求項36に記載の方法。

【請求項39】 該コロイド状金属ナノ粒子がAu、Ag、AlおよびCuから成る群より選択される金属から成る請求項35に記載の方法。

【請求項40】 該コロイド状金属ナノ粒子が実質的に球形である請求項35に記載の方法。

【請求項41】 該コロイド状金属ナノ粒子が1nmから150nmの直径である請求項40に記載の方法。

【請求項42】 前もって選択された活性に陽性応答を持っている化合物を同定するための、コンビナトリアルライブラリーの高スループットスクリーニング法であって：

表面プラズモン共鳴活性表面を提供し；

該表面上で多数のスクリーニングアッセイを接触させ、それにより該コンビナトリアル ライブラーの多数の構成物が該表面に付隨され、およびここで該前もって選択された活性の陽性応答は、該表面を持つコロイド状金属ナノ粒子の存在または不在を付隨している；および

該前もって選択された活性に陽性応答を持っている化合物を同定するため、該表面の S P R プロフィールを測定することにより該ナノ粒子の該存在または不在を検出することから成っている方法。

【請求項 4 3】 該表面プラズモン共鳴活性表面が薄い金属フィルムである請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】 該薄い金属フィルムが A u 、 A g 、 A l および C u から成る群より選択される請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】 該薄い金属フィルムでガラス表面上が被覆されている請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 6】 該コロイド状金属ナノ粒子が A u 、 A g 、 A l および C u から成る群より選択される金属から成る請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 7】 該コロイド状金属ナノ粒子が実質的に球形である請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 8】 該コロイド状金属ナノ粒子が 1 n m から 1 5 0 n m の直径である請求項 4 7 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****技術分野**

本発明は一般的に表面プラズモン共鳴センサーに関する。特に、本発明は表面プラズモン共鳴応答を增幅し、およびその感度、融通性、スループット、特異性および範囲を増加させるための装置、方法および試薬に関する。

背景技術

表面プラズモン共鳴（S P R）は金属薄膜表面近傍の屈折率変化をセンシング（s e n s i n g）するための一般的分光学的方法である。これらの変化に対するその感受性は、もしその化学がうまく設計されるとしたら、金属／溶液界面での化学反応の観察および定量化に利用できる足がかりを提供する。この技術の普遍性のゆえ、バイオセンシングを含む種々の化学系への応用を導いてきた（特異的に設計された市販の装置が利用可能な場合）。

【0002】

S P Rは、表面に拘束された生体分子および液相で生まれた化学種間の相互作用により生じた屈折率の小さな変化の検出を可能にする。例えば、センサー表面への蛋白質の固定化は屈折率の変化、従って金属薄膜の角度依存性反射能の変化が現われる蛋白質結合の検出を可能にする。この型のS P Rセンシングは典型的には、センサー表面としてのA uフィルム上にカルボキシル化デキストランゲルを使用する市販の装置で実施され、ここでゲルは表面に拘束された結合相手のためのホストとして働いている。しかしながら、多数の化学を同時に迅速に問いただすことができるイメージングS P Rを含む、多くの他の様式でもS P Rは応用してきた。同様に、種々の他の表面化学が生体分子相互作用測定のための足がかりとして使用してきた。

【0003】

S P Rは自由電子金属（例えば、T i、C rまたはメルカプトシランの薄い接着層によりガラス支持体へ繋ぎ止められたA u、A g、A lまたはC uの50nm厚フィルム）表面モードの光学的励起に依存している。全内部反射の臨界角より大きなある角度での、ブミリズー結合フィルムの後部一側、p-偏光化照射は

、金属一溶液界面でのプラズモン励起を生じる。プラズモン励起は、最適カップリング角で、光学吸収の増加（屈折率の減少）として観察される。このことは次に、SPRプロフィール（反射能と角度のプロット）の極小を生じ、それはプラズモン角度（ θ_p ）と称されている。SPRによるセンシングは、金属表面付近での屈折率の変化に対する θ_p の感受性のため可能である。金属一溶液界面で起こる吸着、脱離および分子一分子相互作用がそのような変化を起こし、それによりプラズモン角度のシフトを誘導する。これらの変化はリアルタイムでモニターでき、SPRを動的センシングに適したものにしている。

【0004】

SPRを使用する化学のもっとも広く研究されている分野は多分、蛋白質一蛋白質相互作用であり、結合が起こったことによる信号変換を従来の光学的分光法で達成することは困難または不可能である。非特異的結合を減少させるため、および生体分子の表面充填を増加させるため、市販の装置上で実施されるSPR実験は、表面のセンシングと関連して伸長されたカップリングマトリックスを通常使用する。そのような測定は典型的には、薄く蒸着したAuフィルムの上部に層積したカルボキシル化デキストラン（または“伸長したカップリング”マトリックスを含む有標基体上に固定した一つの蛋白質から始められる（即ち、フィルムと試料の間）。結果はAuフィルムの表面から約200nm離れて拡がっている伸長された3次元アレイである。デキストラン層の屈折率に小さな変化を導く蛋白質結合は、角度依存性の弱められた全屈折における相応する小さな変化を通して検出される。デキストランマトリックスにより提供される信号増幅にもかかわらず、小さな分子(<1000MW)の検出はまだ市販の装置には大変な仕事である。いくつかの場合、2,000-10,000MW範囲の種の検出さえも難しいと立証できる。

【0005】

カップリングマトリックスの使用には、信号を支配する生体分子との非特異的相互作用および大きな分子の排除を含む多くの付加的な欠点が付随する。さらに、マトリックス内の生体分子の不適切な配向はしばしば生体分子の低い活性を導く（特に蛋白質）。マトリックス中に固定された分子への大量輸送は通常pH依

存的であるため、マトリックス内への試薬の最適な拡散には別の工程がアッセイの間に必要とされる。これらの短所は、アッセイの設計において著しい困難をもたらしている。二機能性有機クロスリンクカーの単一層で修飾されたAuフィルムのような平面SPR基体を使用することにより（即ち、上に層積するマトリックスなしで）、これらの問題を避けることが望ましいであろう。しかしながら、これらのより同型の基体内のSPR反射率変化は、実際のアッセイで測定するにはしばしば非常に小さい。

【0006】

SPRの応用性および有効性は、もしリガンド結合が屈折率により明白な変化、および、そのためプラズモン角により明白なシフトを生じるとしたら、顕著に拡張することができる。そのように感度を高くすると、本技術を低分子量薬剤候補の高スループットスクリーニングへ広く応用可能にできる。

【0007】

化学アッセイ、特に捕捉試薬（例えば、抗体）の単一層または亜単一層で被覆した平面SPR基体上での生体分子認識アッセイにおいて、SPR屈折率変化増幅のための装置、方法および試薬を提供するのが本発明の目的である。超高感度で、PCRに基づかないDNA検出アッセイのための方法および試薬を提供するのも本発明の目的である。さらに、3-オングストロームの分解能で、1から500nmのスケールの表面拘束物体間距離を測定するためのSPRに基づいた方法を記述するのも、本発明の目的である。

【0008】

増幅イメージングSPRにより高スループットスクリーニング反応（一次および二次の両方で）を可能にするのも本発明の付加的な目的である。

本分野で使用されている、扱いにくい蒸着法と置き換えて（または代わりに）、SPR（または他の表面分光学法）のためのAuフィルム合成のための“湿式化学”法を提供するのも本発明のさらに別の目的である。

【0009】

最後に、固定された入射角でのフィルム反射率における空間的差を描写できるイメージングSPR装置を提供するのが本発明の目的であり、ここで空間的差は

異なる屈折率またはフィルム厚（即ち、異なる化学修飾）により誘導される。本発明により提供されるイメージングS P R装置は多重生物学的“チップ”アッセイ形式でS P Rを使用することを可能にする。例えば、イメージングS P R装置は、異なった標的検体のためのリガンドが特定の位置に結合されている固形支持体を使用する多標的検体の同時検出に不可欠であろう。

【0010】

本発明の装置、方法および試薬は、先例のない感度および選択性の化学アッセイ（多重バイオセンシングアッセイ）を可能にする。

発明の要約

本発明はS P R屈折率変化増幅のための装置、方法および試薬を提供する。一つの一連の態様において、S P Rに基づいたセンシングアッセイのための光学的標識としてコロイド状一金属ナノ粒子が使用される。これらの態様は、金属フィルムのS P R応答がフィルム表面へのそのようなコロイド状一金属ナノ粒子の局在化により劇的に変化するという観察に依存している。コロイド状金属ナノ粒子の吸着により起こるフィルム表面のS P R応答の劇的変化は、分子認識の発生（例えば、抗体への抗原の結合、リガンドのその受容体への結合、または相補的核酸分子のハイブリダイゼーション）に依存するアッセイに活用できる。多くの可能な手段の一つにおいて、分子認識に関与する一つの分子がS P R基体の金属フィルム表面上に固定化される（または金属フィルムに完全に結合される）。固定化分子との相互作用に関与する別の分子—固定化分子へ直接的に結合することによるか、または第三の分子へ結合し、それが順に固定化分子へ直接的に結合することにより一はコロイド状金属ナノ粒子で標識される。関与する分子間の結合はコロイド状金属吸着を導き、フィルムのS P R応答に付随する変化を伴う。溶液中で単分散コロイド状金属ナノ粒子を製造するための方法は本分野ではよく知られており、生物学的活性の損失なく、金属ナノ粒子へ生体分子を結合させる方法である。いくつかの態様において、コロイド状A uナノ粒子の使用はS P R感度の100,000倍の増加を導いている。

【0011】

例えば、コロイド状A uナノ粒子は標的検体のリガンドへ容易に結合できる。

その後、標的検体がSPRフィルムの表面（またはその上に固定化されたリガンド）へ局在化し始めた時、Au標識化リガンドが表面へもたらされ、標的検体へリガンドが結合した場合、SPR反射率に増幅された変化を導く。信号の増幅は、平面SPR基体（二官能性有機クロスリンカーで修飾されたAuフィルムのようないくつかの型のアッセイには十分な能力がある。このため、本発明はまたデキストランに基づいたマトリックス内のSPR反射能増幅のための方法も提供する。本発明のいくつかの態様において、リガンドへ結合されたAuナノ粒子は最初にマトリックスへもたらされ、アッセイの基礎をなす生体分子の相互作用を通してそこで保持される。ナノ粒子は、ネットワーク内への効率の良い拡散を可能にするため十分に小さな直径であるように選択される。しかしながら、この大きさのナノ粒子はSPR反射率の変化を最適には増幅しない。その結果、増幅を最適化するためには、ナノ粒子はAgめっき溶液の添加により大きくされる。

【0012】

上で議論したような著しい制限にもかかわらず、デキストランに基づいたSPR基体はいくつかの型のアッセイには十分な能力がある。このため、本発明はまたデキストランに基づいたマトリックス内のSPR反射能増幅のための方法も提供する。本発明のいくつかの態様において、リガンドへ結合されたAuナノ粒子は最初にマトリックスへもたらされ、アッセイの基礎をなす生体分子の相互作用を通してそこで保持される。ナノ粒子は、ネットワーク内への効率の良い拡散を可能にするため十分に小さな直径であるように選択される。しかしながら、この大きさのナノ粒子はSPR反射率の変化を最適には増幅しない。その結果、増幅を最適化するためには、ナノ粒子はAgめっき溶液の添加により大きくされる。

【0013】

別の態様において、本発明はAu表面上に無機フィルムを層積することにより、コロイド状Au増幅SPR反射率をさらに促進させる方法を提供する。金属製ナノ粒子および金属表面間の距離は、SPR反射率に著しい影響力を持っている。好適な態様において、SiO₂の30nm厚フィルムが50nm Au表面に蒸着される。コロイド状金ナノ粒子がこの表面に結合された場合—直接的に、または例えば、蛋白質—蛋白質相互作用により—、SiO₂層はAuナノ粒子およびAu表面間のカップリング距離を最適化するためのスペーサーとして働いている。これはSiO₂フィルム無しでコロイド状Auナノ粒子およびAu表面を使用して観察されるよりも、プラズモン角（即ち、最小反射能の角度）の大きなシフトを導いている。この向上は、Au表面が非常に低レベルのコロイド状Auへ結合されている場合でさえも（例えば、1%未満の表面被覆度）観察される。

【0014】

別の一連の態様において、本方法は“サンドイッチ”イムノアッセイを提供するため使用される。特に、標的検体に対する一次“捕捉”抗体はSPR基体の表面上、Au表面それ自身かまたは層積されているSiO₂フィルム（または他の物質）に固定化されている。標的検体に対する二次抗体は、種々の方法の一つによりコロイド状Auナノ粒子と複合されている。Auナノ粒子およびSPR基体をその後、標的検体を含んでいると疑われる生物体液と接触させる。もし存在すれば、標的検体は固定化捕捉抗体との相互作用を通してSPR基体と結合されるようになり、およびコロイド状Auは二次抗体および結合された標的献血体間の相互作用を通してSPRへ局在化するようになるであろう。その結果、プラズモン角の増幅された変化が観察されるようになり、二次抗体がコロイド状Auナノ粒子へ複合されない場合に観察される角シフトに関して増幅される。いくつかの場合、本方法はデキストランに基づいたマトリックスを使用する通常のSPRアッセイと比較して100,000倍またはそれ以上のSPR信号増強を提供し、70 fM未満の蛋白質濃度を検出する能力を提供する。そのようなアッセイは分離された工程で実施できることは当業者には明白であり、ここで検体含有溶液は最初に表面に暴露され、非特異的結合を除くために洗浄工程が実施される。次に、第二の工程において、コロイド状Au：抗体複合体が導入される。

【0015】

別の一連の態様において、本発明の方法は標的核酸配列を検出するために応用される。例えば、“第一の核酸プローブ”は平面SPR基体の表面上に固定化され、および“第二の核酸プローブ”はコロイド状Auナノ粒子へ複合化される。標的配列の存在下、両方のプローブが会合するようになるように、プローブは少なくとも部分的に標的核酸配列と相補的な（またはいくつかの他の相互作用ができる）領域を持っている。その結果、第二の核酸プローブへ複合されたコロイド状Auナノ粒子はSPR基体へ局在化するようになり、増幅されたプラズモン角シフトが存在する。本発明の方法は約5桁のダイナミックレンジで、24-mereオリゴヌクレオチドに対して 8×10^7 分子/cm²より良好な定量限界を可能にする。これは本発明の増幅法を使用しないで観察された感度の1000倍以上の改良である。この態様においてはその上、第二の核酸プローブの導入は標的配

列導入の前でも、同時でも、または後でもよい。

【0016】

本発明はまた、走査様式というよりもむしろイメージング様式で働くことができるSPR装置を提供する。走査様式SPRは、特定された範囲内で入射角の各々の角度（および／または入射光の波長）で全SPR基体に対する単一のSPR反射率を測定する。イメージング様式装置は、一つまたはそれ以上の前もって決定された入射角の角度で、SPR基体を通過する局所SPR反射率を描くイメージを提供するために電荷結合素子（CCD）を使用する。選択された入射角の角度は、SPR反射率でアッセイされる出来事（例えば、固定化されたリガンドのその標的への結合により）の発生によりSPR反射率の最も大きな変化が観察される角度である。このことは多重アッセイの目的のため、マイクロアレイ様式での検出の基礎としてSPRを使用することを可能にする。そのようなアッセイにおいて、SPR装置は、標識検体を含んでいると疑われる液体の添加後にSPR基体の規格化された反射能イメージを捕捉する。得られたイメージにおいて、基体上の各々の“スポット”においての反射能信号強度は、その位置に存在する標的検体量についての情報を与える。本明細書に説明したイメージングSPR装置は大量の試料の簡単な導入を可能にする（50mm×50mmマイクロアレイ基体までの、市販品として利用可能な光学素子を使用して）。さらに、特注光学素子では、より大きな表面（例えば、6インチ×6インチ）が使用できる。従来記載されているSPR装置と異なり、本発明のイメージング装置は独特の水平試料幾何学的配置を提供するので、それは基体取り扱いおよび液体送達を調節するためのロボット的操作を可能にする。この幾何学的配置は、従来の技術の装置で必要とされたような、垂直のSPR基体上へ溶液を流す必要性を回避している。

【0017】

粒子および／または表面への修飾は、SPRの感度および選択性を増加させることを目的としており、以下のものの使用を含んでいる：（i）表面への両性カップリングの波長－依存性成分を最適化するように設計されたAuS/Au芯－殻粒子のような新型の金属ナノ粒子；（ii）減少した非特異的結合を示し、および粒子へ結合された生体分子の数の調節を可能にする精巧な表面機能化を持つ

粒子；(i i i) 局所場促進を提供するように設計された副波長孔を持つ基体；および(i v) 粒子-表面カップリングの距離依存成分を最適化する酸化物-被覆金属フィルム。感度を増加させるための装置的取り組みには、同調した励起波長の使用、SPRと平行の角度-依存性表面プラズモン散乱の測定、および干渉法的SPRが含まれる。SPR感度を改良するための第三の態様手順は、二つの二次的信号增幅スキームの使用が含まれる。一つは粒子“発育”に基づいており、そこでは、固定化粒子の寸法を成長させるために選択的化学が使用される；第二はカスケード効果に基づいており、そこでは、一つの金属ナノ粒子の分子認識-誘導結合は、溶液からのいくつかの他のものによる選択的沈積を導く。

【0018】

異なった化学のためのSPR基体領域の境界を限定するため、一つの方法が印刷された回路板の使い捨てレプリカを製造するために開発されている。得られる“ナノビーカー”（ポリジメチルシロキサンまたはPDMSから仕上げられた）は小さな表面で、多数の空間的に別個の領域を個々に扱うことを可能にする。そのようなマイクロウェルアッセイの使用は、0.1%未満の単一層のAu粒子被度における変化がイメージングSPRにより容易に検出されることを例証している。

発明の詳細な説明

本発明は、この一般化されたセンシングスキームにより可能にされた超高感度バイオセンシングアッセイのための多くの詳細なプロトコールを提供する。しかしながら、本発明の理解を助けるため、SPR基体の金属フィルム上へのコロイド状金属吸着（分子相互作用を経た）で観察されるSPR応答促進の詳細な説明もまた提供される。以下の定義もまた提供される：

“SPR基体”とは、表面プラズモン共鳴現象（即ち、プリズムへ結合された場合の自由電子金属における表面モード（プラズモン）の光学的励起）が観察できる任意の物質を意味している。好適な態様において、SPR基体はガラス表面上に沈着された、または蒔かれた自由電子金属フィルムを含んでいる。自由電子金属にはAu、Ag、AlおよびCuが含まれるが、それらに限定されるわけではない。本発明はまた、合金または金属の混合物の使用も企図している。

【0019】

“SPR反射能”（または“反射率”）とは、SPR基体が結合されているプリズムから反射された光強度の変調を意味している。SPR反射能は、表面プラズモンがSPR基体で励起された場合に最小である。SPR反射能値は入射照度の初期強度の0%から100%の範囲であり得る。

【0020】

“SPRプロフィール”とは、種々の入射角度での（または入射光の種々の波長での）SPR基体のSPR反射能値を意味している。SPRプロフィールはしばしば入射角度に対する（または入射光の波長に対する）SPR反射能としてグラフに描かれる。“入射角度”とは、プリズムに光が入り込む時、SPR基体が結合されているプリズム面に出会う角度を意味している。

【0021】

“プリズム”とは、SPR基体と結合された光学的要素であり、それを通して入射光が方向付けられる、例えば、磨かれたSF11ガラス、その上にAuフィルムが蒸着されている。本発明の好適なプリズムには三角形プリズム（最も好適には70°-70°-40°の幾何学的外形を持つ）、および半球形プリズムが含まれる。

【0022】

本明細書の多くの実施例および態様はAuフィルムおよびコロイド状Auナノ粒子の使用を説明しているが、SPR応答を持つ他の金属（合金および金属の混合物を含んで）もまた企図され、本発明の範囲内であることを理解するべきである。同様に、本明細書に説明されている本発明の方法の実施例はしばしばバイオセンシングアッセイに向けられているが、本方法はまた、SPRに基づいた他のセンシング形式にも応用可能である。

【0023】

本発明の重要な特色は、本発明のSPR技術を使用する多重アッセイの能力である。空間的多重化（即ち、アレイ化）が金属基体上の試薬の物理的分離により可能にできる。しかしながら、追加の多重化は金属ナノ粒子の特性を変化させることにより達成できる。変化するものには、金属コロイド状ナノ粒子のサイズお

より組成の変化が含まれる。そのような多重化は従来の S P R を使用して最もよく調べられ、フィルムの反射能（並びにそれらからの散乱）がすべての入射角度で容易に測定できる。しかしながら、多重化は、可能なら光反射率および散乱の両方を連結して、および理想的には反射率を入射角の関数として測定した後に、イメージング S P R を使用して実施できる。

【0024】

図1はA u フィルムへのコロイド状A u 吸着を伴う S P R 応答の変化を示している。S P R プロフィール（入射角の関数としての反射率）を描くため、50 nm厚A u フィルムは二機能性有機リンカー、2-メルカプトエチルアミン（MEA）で修飾された。MEAのチオール基はA u フィルムへ結合され、遊離アミノ基を表面上に露出して残している。実線は43.7°の角度で鋭いプラズモン最小（最小反射率値）を示している。A u フィルムが11nm-直径コロイド状A u の17nM溶液へ1分間暴露された場合、A u 粒子はこれらの遊離アミン基を通してA u フィルムへ結合する。図1で点線で示したように、このことは最小反射率値の有意な増加、S P R プロフィールの広がり、およびプラズモン角度の0.2°のシフトを生じる。

【0025】

A u フィルムのコロイド状A u ナノ粒子への暴露をより長い時間にすると、これらの変化の程度が増加することが観察された。従って、60分の暴露では、プラズモン角度が2.6°シフトし（即ち、46.3°へ）、局在化コロイド状A u ナノ粒子なしのA u フィルム（“裸の” A u フィルム）の最小反射率値よりもほぼ40%ほどその値が増加した。図1のS P R プロフィールを発生させるために使用された材料および方法のより完全な議論は実施例1に提供されている。

【0026】

これらの結果は、A g 表面上へ蒸着された薄い炭素被覆により誘導された劇的なシフトに似ており、そこではフィルムの強い吸着力が著しい程度のプラズモン減衰を誘導する。単一の理論または機構に縛られるのを望むわけではないが、A u -コロイド吸着によるS P R 変化は、これらの粒子は非ゼロの想像上の誘電成分を持っているので、類似の吸着減衰過程が原因であると思われる。第二の可能

な（排他的ではない）減衰の機構は、粗くしたAuフィルムおよび他の粒子修飾フィルムで観察された効果に類似した状況である、コロイドの局在化表面プラズモンとAuフィルム中の伝搬しているプラズモンとのカップリングを含んでいる。

【0027】

反射率変化の時間経過を最小反射率でモニターした場合、>1%反射率変化はコロイド吸着の最初の100msで容易に観察される。この時点での表面被度は密に充填された単一層のおおよそ0.1%である。もし、プラズモン角変化が表面被度に直線的に変化し（低被度に対しては合理的な仮定）、装置角分解能限界が0.005°だとしたら、表面被度の40倍の（0.2°/0.005°）減少が検出可能である。従って、12nm-直径コロイド状Au単一層の0.0025%（ 2.0×10^7 粒子/cm²）が容易に観察できる。以下に議論するようさらにより低い被度が、より大きな直径のAuコロイドを使用して観察可能である。時間の関数としての反射率の時間変化は図1に挿入されて示されている。

【0028】

Auフィルム基体のSPR応答におけるコロイド状Au吸着の影響は、コロイド状ナノ粒子のサイズに劇的に依存している。図2の実線はMEAで被覆し、その後続いて同数の密度（ $1.3 \pm 0.15 \times 10^9$ 粒子/cm²）の30、35、45および59nmの直径のコロイド状Auで被覆した47nm厚AuフィルムのSPR応答を示している。比較的低い数の密度にも関わらず、SPRプロファイルは粒子サイズで劇的に変化し、2倍未満の直径の増加で最小反射率は10%から35%へ増加した。実際、最も大きな粒子サイズ（59nm）では、SPRプロファイルは裸の蒸着フィルムのものとはほとんど似ていない；プロファイルは浅くおよび幅広く、SPRで典型的に観察される明確なプラズモン最小を持っている。図2のSPRプロファイルを発生させるために使用された材料および方法のより完全な議論は実施例1に提供されている。

【0029】

単位領域当たりのコロイド状Au粒子の数は図2に示されたデータでは一定に

保たれたが、分割表面被度は粒子サイズで変化していることに注目することは重要である。言い換えれば、等しい数の二つの異なったサイズの粒子は異なった幾何学的領域を覆うであろう。このことを考慮に入れると、30、35、45および59 nm直径のAu粒子の分割被度は、各々密に充填された単一層の1.2、1.6、2.6および4.5%である。

【0030】

図3は35 nm(図3A)および45 nm(図3B)直径コロイド状Au粒子についての表面濃度(粒子数/ cm^2 で表現されている)に関して、SPRプロフィールで起こった変化を示している。35 nm粒子の場合、低い数の粒子密度は比較的小さなプラズモン角シフトおよび反射率変化を誘導している。数密度が増加するにつれて、最小反射能の位置および程度の変化が大きくなり、最後には、約7°の全プラズモンシフトおよび>40%の反射率増加に達した。いくぶんより大きな角シフトが45 nm直径コロイドAu粒子に関して観察される；プラズモン角の最初の変化は著しく、表面濃度を増加させるにつれ急速に増加する。しかしながら、SPRプロフィールの形は45 nm直径粒子の場合にはさらに急速に進展し、最も低い表面濃度で>30%反射率が観測される。この傾向は他のサイズのコロイド状Au粒子でも同様であった—より小さい振動が30 nm直径粒子で観察され、およびより大きな初期反射率変化が59 nm直径粒子で観察される。

【0031】

実際的な観点からは、SPRセンシング形式で重要なのはプロフィールの全体の振動ではなく、プラズモン角シフトまたは反射率で観察できる最大変化(増加または減少)である。図2および3に示されたデータから、より高い表面被覆では、正確なプラズモン角を求めるのにSPRプロフィールはむしろ広がりすぎていることが明らかである。従って好適な態様においては、装置的および感度両方の観点から、反射率変化それ自身は界面の誘電特性の点からは明瞭な物理的意味を持っていないという事実にも関わらず、单一角度で反射率変化を測定することがより実際的である。

【0032】

好適な態様において、反射率を測定するために選択された角度は、Auフィルムへのコロイド状Auナノ粒子の結合により最大反射率変化を起こす角度である。最大反射率変化はAuコロイド修飾フィルムおよび非修飾フィルムのSPRプロフィール間の差を考慮することにより決定できる。図4は図3に示したデータから計算された差プロフィールを示している。35nm直径粒子（図4A）および45nm直径粒子（図4B）の両方で、反射率の最大増加が43.7°で観察された。この結果は、非修飾フィルムのSPRプロフィールの最小がAuコロイド修飾フィルムに対する最適観察角度であることを示唆している。ここで観察された、大きなサイズの反射率変化は、より低い表面濃度が観察可能であることを示唆している。実際、45nm直径粒子において、 1.3×10^9 粒子/cm²の数密度は40%の反射率変化を生じる。現在の走査型SPR装置は<0.1%の反射率変化を検出できるので、低被度での直線的SPR応答を仮定すると、400分の1低い表面被度を検出することが可能である（ 3×10^6 粒子/cm²、単一層の0.0065%に相当する）。

【0033】

図5において、反射率の最大変化が、30nm、35nm、45nmおよび59nm直径コロイド状Au粒子について、数密度の関数としてプロットされている。すべての粒子直径について、差プロフィールのピークは約43.7°であり、再び理想的な角度は粒子サイズによらず同一であることを示している。最も大きな信号が観察されるであろう角度をアッセイの実施に先立って知ることができるので、アッセイおよびセンシング応用に関して、このことは粒子促進の明白な利点である。いくつかの場合、このことは、固定化物質の量を決定するための高分解能走査の必要性をなくすことができる。特定の角度におけるパーセント反射率の測定はまた、より高い表面被度では絶対プラズモン角の決定が困難になるので、より誤りを少なくする。

【0034】

本発明の焦点はSPRであるが、特徴付けを助けるために使用された他の分析技術を含むことに注目しなければならず、他の技術はそれ自身で感度のよいDNA検出を提供できる。従って、著しい非特異的粒子結合不在下では、単一のナノ

粒子は容易に原子間力顕微鏡法、フィールド発光走査型電子顕微鏡法または近距離走査型光学顕微鏡法により可視化される。もし、DNAに必要とされる検出限界がSPRにより達成できないならば、他の技術が利用できる。

バイオセンシングアッセイ形式

本発明の方法を容易に使用できる一つのアッセイ形式は、本分野でよく知られている“サンドイッチ”アッセイである。サンドイッチアッセイは一般的に以下のように組織化される：固形支持体上に固定化されたリガンドAは標的検体Bへ結合でき、それは同時にリガンドCを結合できる。接触させた時、固形支持体上に、A、BおよびC間で複合体が形成される。もし、リガンドCが検出可能な“タグ”で標識されているとすると、次に固形支持体上に存在する検出可能タグの信号を測定することにより標的検体Bの量が定量できる。この基本的スキームには多くの変化が可能であることが理解されるであろう。“標的検体”はアッセイの主題である任意の検体である；本発明の好適な標的是、核酸、蛋白質、ホルモン、糖および代謝物を含む（これらに限定されるわけではない）生体分子である。“リガンド”とは標的へ結合できる任意の種である；本発明の好適なリガンドには、抗体および核酸が含まれるが、これらに限定されるわけではない。サンドイッチアッセイ形式は、通常イムノアッセイで使用され、ここで“リガンド”は標的検体に向けて方向付けられた抗体である。

【0035】

図6はサンドイッチ形式の例を示しており、そこでは抗原に対する第一抗体がAuフィルム上に固定化されている。抗原に対する第二抗体はコロイド状Auナノ粒子へ対結合されている。接触させた場合、第一抗体、抗原およびコロイド状Auナノ粒子へ対結合された第二抗体間で複合体が固形支持体上に形成される。

【0036】

図7は平面SPR基体（即ち、薄く覆うマトリックスがない伝導性フィルムから成る）を使用し、図6に示した形式でのアッセイからのデータを示している。このデータを得るために、50nm厚Auフィルムは最初に3-メルカプトプロピオン酸(MPA)で修飾され、それによりカルボン酸終結自己集合化単一層(SAM)を形成する。この修飾フィルム単独で得られたSPRプロファイルは

図7 Aの実線で示されている。次に、 γ 鎖-特異的モノクローナルヤギ抗ヒト IgG抗体 [a-h-IgG (γ)] (“第一抗体”または“一次抗体”) を抗体の遊離アミノ部分へのカルボジイミドカップリングによりカルボキシル化単一層へカップリングさせた。修飾フィルムとヒトIgG [h-IgG; 150 kD] (“標的抗原”) の0.09 mg/mL溶液とのインキュベーションは、プラズモン角に0.04°のみのシフトを生み出した。このことは図7 Aの点線により示されている。実際、プラズモン角シフトはそれほど小さいので、抗原(h-IgG)存在下のSPRプロフィールは修飾フィルム単独から得られたSPRプロフィールとほとんど重なっている。このフィルムをさらにFc特異的モノクローナルヤギ抗ヒト免疫グロブリンG抗体 [a-h-IgG (Fc)] (“第二抗体”または“二次抗体”) の8.4 mg/mL溶液に暴露しても、小さな(0.06°) プラズモン角シフトしか生じない。このことは図7 Aに長い点線で示されている。しかしながら、二次抗体が10 nm直径Au粒子との静電的対結合体 [a-h-IgG (Fc)-Au] として存在している場合、プラズモン角の1.7°シフトが観察され、最小反射率の2%の増加、およびSPRプロフィールの検知できる広がりを伴っている。このことは図7 Bに長い点線で示されている。このコロイド誘導1.7°シフトは、同一の平面基体を使用する非増幅アッセイで観察されたシフト(即ち、図7 Aで長い点線で示されているような0.06°)より28倍大きい。従って、このバイオセンシング態様での蛋白質-Auコロイド対結合体の使用により、著しい感度の増加が与えられる。生化学的特異性もまたこれらの条件下で最大にされる-a-h-IgG (γ)で修飾された表面はヒト血清(IgGを除いた)、ヒト免疫グロブリンAおよび[a-h-IgG (Fc)-Au]とはほとんどまたは全く反応性を示さない。a-h-IgG (γ)-h-IgG修飾表面もまた高度に特異的であり、ヤギ抗ヒト免疫グロブリンG1(a-h-IgG1-Au)を持つ10 nm直径Au対結合体へ暴露しても、小さな(0.08°) プラズモンシフトしか導かない。このイムノアッセイで使用された材料および方法のより完全な議論は実施例2に提供されている。

【0037】

前に述べたように、好適な態様において、本アッセイは前もって決定された入

射角でのS P R基体中での反射率変化を測定することにより実施される。最適角は、検出されている生物学的出来事の発生により最も大きい反射率の変化が観察される角度である。サンドイッチアッセイにおいて、この生物学的出来事は一次抗体-抗原-二次抗体“サンドイッチ”の形成である。最適角を決定するため、差S P Rプロフィール（入射角に対する反射率の変化）が、二次抗体および抗原工程で得られたS P Rプロフィール間の差を計算することにより準備される。差プロフィールのピークは二つのスペクトル間の最も大きな差で生じ、それ故、反応間の反射率変化をモニタリングするための最適角を表している。

【0038】

図8は図7で提供されたデータの差S P Rプロフィールを示している。a-h-IgG(Fc)添加の場合、約2%のみの反射率の最大減少が54.3°の入射角で得られる（図8の長い点線）。対照的に、a-h-IgG(Fc)-Au添加の場合、同一の入射角で反射率の～50%減少が観察される（図8の実線）。従って、10nmAu-対結合二次抗体は非対結合二次抗体と比較して25倍の感度の増加を導いている。

【0039】

図9は非対結合およびAu-対結合二次抗体の両方の固定化に対する反射率時間経過を示している。反応をプラズモン角（53.4° 50%反射率）より小さな角度でモニターした時、>40%の反射率変化がAu-対結合二次抗体の場合に観察され（図9で“抗体：Au”と記した線）、一方、同一に調製した表面への非対結合抗体の固定化は<2%未満の反射率変化しか生じない（図9で“遊離抗体”と記した線）。このことは、生物特異的相互作用のリアルタイムモニタリングに頼るアッセイにおける感度増強を例示している。この増強は、蛋白質-Au対結合が遊離抗体よりも6桁以上希釈されているにもかかわらず得られることに注目しなければならない（17nM対56mM）。

【0040】

本発明の粒子増強方法論の効用は、低濃度の抗原で最も目立つようになる。図10はコロイド状Au-誘導プラズモン角の変化をh-IgG濃度の関数として示している。使用されたh-IgG濃度は3mM（図10A）、0.3mM（図

10B)、3.0 nM(図10C)および6.7 pM(図10D)である。各々の図において、実線はa-h-IgG(γ)修飾フィルムのSPRプロファイルを示しており；長い点線はh-IgGのみの存在下でのa-h-IgG(γ)修飾フィルムのSPRプロファイルを示しており；点線はh-IgGおよびa-h-IgG(Fc)-Au両方の存在下でのa-h-IgG(γ)修飾フィルムを示している。予想されるように、溶液抗原濃度をほとんど6桁にわたって変化させると(3.0 μ Mから6.7 pMへ)、観察されたプラズモンシフトは減少する。最も低いh-IgG抗原濃度-3.0 nM(図10C)および6.7 pM(図10D)-では、a-h-IgG(Fc)-Au不在下では検出できないSPR変化を誘導する。これらの低抗原濃度にもかかわらず、10 nm Au-対結合二次抗体が使用された場合には、粒子固定化による著しいシフトがなお明瞭である。調べられたh-IgGの最も低い濃度でさえ(6.7 pM=1.0 ng/m²)、0.33°の容易に検出可能なシフトが生じる(図10D)。このシフトが分析される容易さは、10 nm Au対結合二次抗体の実際の検出限界はピコモル範囲よりもさらに低いことを示している。

【0041】

上で説明したイムノセンシング態様はすべて平面SPR基体を使用している(即ち、一次抗体が共有結合で結合されることになる二機能性有機リンカーの単一層で修飾されたAuフィルム)。背景技術で議論したように、市販品として利用可能なSPRアッセイは、典型的には、一次抗体のような捕捉分子を濃縮するため、伸長されたカルボキシル化デキストランマトリックス(例えば、200-400 nm厚)で被覆されたAuフィルムを使用している。フィルム表面に局在化されるべき分子(例えば、一次抗体)はデキストランマトリックスにより共有結合で結合されており、表面から~200 nm離れて伸びている分子の3次元アレイの形成を生じている。背景技術で概説したように、そのようなマトリックスを使用するのは多くの欠点が存在する。本発明の方法はそのような従来技術の感度を劇的にしのいでいる。例えば、平面SPR基体上で10 nm Au-対結合二次抗体を使用すると、非対結合二次抗体を使用するデキストランマトリックスで実施される同一のアッセイと比較して、検出限界が3,000倍に増強されてい

る。

【0042】

本発明のいくつかの態様において、直径が10nmより大きなコロイド状Auナノ粒子を使用することにより、さらに大きな増大が得られている。例えば、上記のイムノアッセイが41nm Au一対結合二次抗体および平面SPR基体を使用して実施されるとすると、11nm Au一対結合二次抗体を使用する同一のアッセイよりも30倍の感度増幅が得られる。デキストランマトリックスを使用する通常のSPRアッセイと比較すると、このことは感度の100,000倍の増加を意味している。実際、41nm Au一対結合二次抗体および平面SPR基体を使用すると、10pg/mlほどの低濃度でh-IgGを検出することが可能である。

【0043】

本発明のいくつかの態様において、通常のデキストランに基づいたマトリックスがコロイド状Au一促進SPR検出のための基体として使用される。しかしながら、マトリックス孔サイズに依存して、上で使用されたコロイド状Au粒子は立体障害によりマトリックスの内部から排除されるであろう。そのような態様に対しては異なった方法論が必要とされる：マトリックスへ進入するために十分小さなコロイド状Auナノ粒子を使用し、次に、それらがマトリックス内へ入った後、Au³⁺およびNH₂OH、または好適には市販のAgメッキ溶液のような金属メッキ溶液の添加により、それらを選択的に大きくする。この方法により、Auナノ粒子を、SPR応答を著しく促進するサイズへ、メッキ溶液を加えることによりマトリックス内で大きくできる。例えば、前記サンドイッチイムノアッセイに対しては、1.8nmコロイド状Auが二次抗体へ対結合できる。得られた対結合体は、検出されるべき標的検体と一緒に、マトリックス（その中では一次抗体が共有結合で結合されている）内へ拡散できる。マトリックス内での（一次抗体）-（標的抗原）-（二次抗体）複合体作製に続いて、Agメッキ溶液をフィルム上に流してコロイドサイズを大きくする。市販のAgメッキ溶液を使用すると、新規粒子の核形成なしに、対結合Auナノ粒子を選択的に大きくすることが可能である。好適な態様において、デキストランが上に乗っているAuフィル

ム基体は、A g メッキ溶液がデキストランマトリックスの孔を通して直接的にAuフィルムをA g メッキすることを防ぐため、最初に6-メルカプトヘキサノールのような短鎖アルカンチオールで前処理される。この方法が前記h-IgG イムノアッセイを実施するために使用された場合、41 nm Au-対結合二次抗体で実施される同一のアッセイよりも30倍の促進が得られる。非対結合Au二次抗体を使用して実施される同一のデキストランに基づいたアッセイと比較すると、10⁶倍の促進が得られる。

【0044】

すべての前記イムノセンシング様式は、適した一次および二次抗体が利用可能な任意の標的検体の検出に適合できる。加えて、説明した方法は、分子認識における関係種の一つが平面SPR基体上へ固定化でき、および別の関係種がコロイド状Auナノ粒子へ対結合できる、任意の分子認識アッセイへ応用可能である。例えば、レセプターリガンド相互作用は、レセプターを平面SPR基体上へ固定化し、次にリガンドを直接コロイド状Auへ対結合することによるか、または、リガンドへ結合できるコロイド状Au-対結合化抗体を使用することによりアッセイできる。さらに、本発明の方法は、相互作用-駆動吸着よりもむしろ、AuフィルムからのAu-コロイドタグ付け試薬の脱離を研究するために使用できる。

【0045】

ここに説明された方法は、分子認識に基づいたアッセイの二つの例を提供する：（1）認識に関係する分子の一つが誘導体化、平面SPR Auフィルム基体上に固定化されており、および認識に関係する別の分子が～10-150 nmのサイズのコロイド状Auへ対結合されているアッセイ；または（2）認識に関係する分子の一つがAuフィルム上に横たわっているデキストランマトリックス内に固定化されており、および認識に関係する別の分子が、対結合された試薬がデキストランマトリックス内へ拡散することを可能にするのに十分に小さな直径のコロイド状Auへ対結合されており；マトリックス内への対結合体の拡散に続いて、A g メッキ溶液の添加によりAuナノ粒子が大きくされるアッセイ。両方の方法とも信号増幅の独特の方法を提供し、よりよい方

法はいくつかの一般的基準を評価することにより最も良好に決定される。以下に示される基準に加え、特定の目的のための、最良の方法の決定において他の基準が当業者には明らかになるであろう。

【0046】

最も重要なことは固定化されるべき捕捉分子（例えば、“リガンドA”または“一次抗体”）および検体のサイズおよび性質である。大きな分子はデキストラン内への拡散から排除されるであろう；従って、最も敏感な領域（表面近傍）で利用不可能である。同様に検体が大きいと、固定化レセプターへの拡散が不可能である。デキストランマトリックスはまた、DNAハイブリダイゼーションまたは膜研究の場合のように、レセプター結合のために捕捉試薬の特定の配向が必要だとしたら実用的ではない。平らな表面上にDNA、二重膜または蛋白質を正しく配向させる多くのプロトコールが本分野で知られている。

【0047】

標的分子の濃度もまた考慮しなければならない。h-IgGに関しては、低濃度（100 ng/ml - 100 pg/ml）が11-nm直径Auコロイドでの平面フィルム上のAu促進によく適している；およびより低濃度はより大きなコロイドを必要とする。しかしながら、後者の種はより変性しやすいようである（通常は観察されない）。また、蛋白質-結合粒子および表面間の多相互作用の可能性が増加する。対照的に、1.8-nm直径Auコロイド対結合体は1:1の蛋白質対コロイド比を与える（ほとんどの場合）。このことは定量化を助け、および、Agメッキ溶液への最適化された暴露により、非常に低濃度(<100 pg/ml)での検出ができる。しかしながら、Agメッキ後、さらなる免疫化学的操作は不可能である。最後に、両方の表面とも標準技術を使用して再生を受けることができることに注目すべきである。

【0048】

S P R角シフトのより大きな変化が、Auフィルム中の表面プラズモンへより効率的にカップリングすることができる粒子に期待される。それ故、本発明の一つの態様はS P Rタグとしての使用のため、調整可能な吸収スペクトルを持つ粒子を発生させることに関する。Auナノ粒子による光の吸収は、粒子に基づ

いた表面プラズモンの励起を導く（サイズ依存性である効果）。それ故、S P R タグのために吸収スペクトルを調整する、一つの簡単な手段は異なったサイズのAuナノ粒子を使用することである。より大きなコロイド状Auナノ粒子（即ち、35 nmより大きな直径を持つもの）に伝統的に付随する二つの問題は多分散性および不安定性であった（より小さい粒子と比較して）。コロイド粒子の安定性はサイズが大きくなるにつれて減少することが知られているので、不安定性の問題の一部は改良された単分散性を通して解決することができる事になる。さらに、Auナノ粒子が試薬である応用のためには、“試薬等級”（即ち、比較的純粋である）物質を持つことが必須である。

【0049】

より大きな粒子ではより大きな反射能の変化が観察されることを理解するのは容易であるが（多分、粒子当たり、より多くのAu金属との結合に付随する散乱および誘電のより大きな変化の両方のためであろう）、非常に小さな分子Auクラスターでは著しい変化は期待されなかった。より小さな粒子はより大きなAuタグで観察されるよりも少ない劇的シフトを与えるが、それらのより小さい“足跡”は表面のより高度の標識を可能にし、单一粒子の結合が单一生物学的結合に対応するように配置することをより容易にしている。減少させた粒子タグサイズの追加の利点は、タグ化生体分子の拡散が改良されることである。

【0050】

生化学的S P R実験におけるコロイド状Au試薬による効能の別の例には、コロイド状Au—タグ付け蛋白質の結合および置換が含まれる。本発明のこの態様の実施例において、抗一ビオチンが平面S P R基体へ共有結合で結合されている。ビオチニル化コロイド状Au（ビオチニル化BSAの10-nm Auへの吸着により製造される）の導入は、対結合体の低被度を示す反射能の小さな変化を導き、それは順に表面上の少量の活性抗一ビオチンを示している。抗体：抗原—Au複合体が高濃度のビオシチン（抗一ビオチンに結合するビオチンの水溶性類似体）に暴露された場合、コロイド状Auタグ付けビオチンは置換され、S P R 反射能はその本来の位置へ戻る。これらの実験は、S P R表面へのコロイド状Au対結合体の結合は可逆的であり、リガンド置換による低MW種の結合を検出す

るためにS P Rの使用を可能にすることを示している。

【0051】

モデル系として標準I g Gイムノアッセイを使用して、Au-粒子増幅がS P R感度の非常に大きな改良を導けることを示してきたが、この技術はいくつかの他の系へ応用されている、例えば、血清中の生物学的に重要な可溶性因子を検出するために；例えば、サイトカイン インターロイキン-5 (IL-5)。IL-5はTリンパ球により産生され、好酸球増加症の調節に含まれている主なサイトカインであるようである。好酸球はアレルギーに重要であるので、IL-5はアレルギー性疾患（例えば、喘息）の発症において鍵となる重要性を持っていると考えられている。IL-5および他のサイトカインが薬学的に重要なため、これらの分子はバイオセンシングの良好な標的である。Auフィルム上のプロテインA／抗-IL-5に対するIL-5：Au対結合体の選択性が図15に示されている。観察された角シフトは、非特異的互作用 (ST4：Au対結合体) よりも特異的相互作用に対するものがはるかに大きかったST4：Auでは非特異的結合の小さな量 (0. 1°) であった。特異的相互作用は最小で1. 6°シフトした (0. 5% Blockerが非特異的結合を阻害するためにこれらの実験で使用された)。この実験はAu-増幅感度およびこのアッセイの選択性の両方を示しているが、生物学的試料は遊離サイトカイン、サイトカイン：Au対結合体ではない、を含んでいるであろう。そのような試料中のIL-5を検出するため、擬一競合的アッセイが使用される。この実験において、プロテインA／抗-IL-5被覆Auフィルムは血清を模倣するため、最初に高濃度のヒト血清アルブミン存在下で遊離IL-5へ暴露される。S P R曲線を集めた後、表面はIL-5：Au対結合体へ暴露される。抗IL-5／IL-5相互作用の遅い解離動力学のため、対結合体への暴露によっても、あつたとしてもほんの少しのIL-5しか表面から置換されず、むしろ、IL-5：Auは表面上の“開かれた”抗体にのみ結合する。それ故、対結合体への暴露により生じる角シフトの量は、最初の（“血清”）試料中の検体量に逆比例する。

【0052】

本発明の好適な態様において、コロイド状Au-対結合S P R応答のさらなる

促進が、Auナノ粒子およびAuフィルム間のカップリング距離を最適化することにより得られる。いくつかの態様において、無機スペーサー、好適には熱蒸着により沈着されたSiO₂が、コロイド状AuおよびAuフィルム間の距離を増加させるためにAuフィルムの表面上に置かれる。別の態様において、カップリング距離の最適化は、静電的相互作用により積み重ねられた、一つまたはそれ以上のポリマー層、好適にはポリスチレンスルホナートおよび／またはポリアリルアミン塩酸塩をAuフィルムに層積することにより達成される。特に好適な態様において、30-40 nm厚のSiO₂層が12 nmコロイド状Auと共に使用される。図11は、Auフィルムが15 nm(図11A)、24 nm(図11B)および33 nm(図11C)厚のSiO₂層で被覆され、その上に12 nmコロイド状Auを持っている場合に起こるSPR応答の漸進的促進を示している。各々の図において、線AはSiO₂層または局在化AuコロイドなしでのAuフィルムのSPRプロフィールであり；線BはSiO₂層のみを持つAuフィルムのSPRプロフィールであり；線CはSiO₂層およびAuコロイドが付着したAuフィルムのSPRプロフィールである。スペーサー層積の厚さは、(i) Auフィルムの厚さ；(ii) フィルムの組成(例えば、Agフィルムでは異なる結果が得られるであろう)；(iii) 励起波長；(iv) コロイド状Au粒子のサイズ；(v) コロイドの組成(例えば、コロイド状Agでは異なる結果が得られるであろう)；および(v) 表面被度に依存し、ある種の量の固定化されたコロイドに対して最大のシフトを生み出すことが理解される。加えて、金属酸化物、硫化物、窒化物または陽性酸化状態の金属イオンを含む任意の他の物質を含む(これらに限定されるわけではない)、適したスペーサーであり得る多くの他の物質が存在することが理解されるであろう。

【0053】

SiO₂層積では、30 nm厚が感度を3倍改良する。同様の結果が別のカチオン性およびアニオン性ポリマーから成るポリマー性スペーサー層で観察されている。この開発は検出限界の改良を導くのみでなく、ガラス表面上で使用されるすべての付着化学にも可能性を広げ、フィルム安定性を改良できる。

【0054】

SiO_2 被覆（薄くおよび間違なくいくぶん多孔性であるが）はまた、化学的攻撃から下に横たわっている金属を保護するためにも働いている。Auフィルムには反応性は関係ないが、酸化はSPRでのAg金属の使用を妨げるであろう。Agフィルムはより鋭い角一依存性反射能曲線を持っていることが知られているので、その急速な酸化がなければより良い選択であろう。

【0055】

金属フィルムからのコロイド状ナノ粒子の距離をSPR検出により本質的に測定できることが、本発明の重要な特性であろう。この特性のため、フィルム表面上で実施されているアッセイは、コロイド状ナノ粒子の存在または不在を要求する必要がない。むしろ、本発明に従うと、検体の存在が金属フィルム表面からのコロイド状ナノ粒子の距離を増加または減少するように働くことのアッセイを実施することが可能である。

【0056】

本発明の好適な態様は金属SPR基体のSPRプロファイルを促進させるためにコロイド状Auナノ粒子を使用する。しかしながら、金属ナノ粒子はAg、Cu、Alまたは二つまたはそれ以上のAu、Al、AgおよびCuから成る合金を含んだ（これらに限定されるわけではない）、複雑な屈折率を持つ他の物質を含むことができることを理解するべきである。別の態様において、金属ナノ粒子は、任意の金属、任意の酸化物、任意の硫化物、任意の燐化物、または任意の有機または無機ポリマーの殻により実質的に被覆されたAg、Al、AuまたはCu（または二つまたはそれ以上のこれらの金属による合金）の芯から成っている。加えて、好適な態様は実質的に球形の金属ナノ粒子を用いるが、他の形もまた企図されていることを理解するべきである。

【0057】

広範囲の波長“調整性”がAuS芯/Au殻粒子で可能であり、それはHausおよびHallasのグループにより記載されている。例えば、Averitt et al., Phys. Rev. Lett. 78: 4217-4220 (1997) を参照されたい。製造条件を変化させることにより、第二の λ_{\max} の位置（殻に対する芯のサイズ比の調節指標）を調整することが可能である。図16

はこれらの粒子のいくつかのバッチに対する光学スペクトルを示している。63
 2 nm に著しい吸収を持っている粒子が特に好適であり、それはSPR研究で最も普通に用いられるレーザー波長であるからである。表面プラズモンのこの波長での強い吸収は程度の高いフィルムーナノ粒子カップリングを生じ、それは順に、より大きいSPR応答および促進された感度を導く。

【0058】

粒子製造における多分散性は、增幅が粒子サイズの関数であるので、SPRデータの説明において困難を生じる。コロイド状Auに使用された方法と類似の方法（即ち、厳格な清潔度、限外濾過溶媒、迅速な試薬添加、急速攪拌および還流）によるAuS/Au殻粒子の合成は、単分散性への著しい改良を導く。吸光係数の定量的測定が得られたAuS/Au粒子に対し、溶液中および表面上で行われた。表面上、粒子被覆度がAFMおよびFEM-SEMによりあいまいなく確立された。溶液中、SおよびAu原子吸光が、すべての粒子が凝集／遠心分離により取り除かれているように調製された溶液試料で実施された。このことは加えられたAuの100%が分散可能な粒子へ変換されたかどうかを決定することを可能にする。続いて、TEMイメージ分析および静的光散乱の組み合わせが、平均粒子サイズおよび分散性を確立するために使用される。これらの数字は順に、溶液での粒子濃度を計算するために使用できる。両方の組の測定に対し、観察されたデータは、芯-殻吸収および散乱を計算するためのBohrenのプログラムを使用して理論と関係づけられる。

【0059】

超高感度SPR応用における芯／殻粒子の最適条件を決定するため、多波長でSPRスペクトルが集められ、粒子の光学スペクトルに基づいて期待される挙動と結果が比較される。もちろん各々の波長で、異なったAuフィルム厚および異なる採集角度が最適化される；これらのパラメーター間の関係はFresne式により与えられ、利用可能なソフトウェアを使用して非常に効率的にモデル化できる。

DNAハイブリダイゼーションの超高感度SPR検出

ある種の好適な態様において、本発明のコロイド状Au促進法はDNAハイブ

リダイゼーションを検出するために使用される。本発明の一つの態様において、標的DNA配列を含んでいると疑われる溶液が、溶液内の核酸へコロイド状Auを対結合する試薬で処理される。対結合後、核酸の溶液は、標的DNA配列と相補的な配列を持っているオリゴヌクレオチドプローブで修飾されている、平面SPR基体と接触させる。もし標的が存在するならば、それは固定化プローブへハイブリダイズし、それによりコロイド状AuをAuフィルムの表面へ結合する。フィルムのSPR応答に生じる変化はモニターでき、標的の存在が検出される。金属フィルムへ核酸を付着させるための方法は、本分野ではよく知られている。例えば、アミン修飾核酸はカルボン酸基への1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド/N-ヒドロキシスルホスクシンイミド架橋を経て16-メルカプトヘキサデカン酸-誘導化表面へ付着できる。AuフィルムへのDNA付着のための方法はHerne et al., J. Am. Chem. Soc. 119: 8916-8920 (1997)に提供されている(全体が参考文献として本明細書へ組み入れられる)。

【0060】

いくつかの好適な態様において、“サンドイッチアッセイ”一型ハイブリダイゼーション形式がDNA検出に使用される;例は図により図12に示されている。この例において、標的DNA配列(S2)の第一の部分と相補的な配列を持つオリゴヌクレオチドプローブ(S1)は、平面SPR基体の表面に固定化されている。SPR基体は次に、標的DNA配列(S2)を含んでいると疑われる溶液と、およびまた、標的配列の第二の部分と相補的な配列を持っているコロイド状Au-対結合オリゴヌクレオチド(S3:Au)と接触させる。S1およびS3:Auの配列は、標的(S2)存在下で配列S1、S2およびS3:Auが三連ハイブリダイゼーション複合体を形成するように設計される。この方法により、コロイド状Auは、もし標的配列(S2)が存在する場合にのみAuフィルムの表面に持ち込まれる。生じるフィルムのSPR応答の変化は、標的配列の存在を検出するためにモニターできる。

【0061】

コロイド状Auは本分野では既知の多くの方法によりオリゴヌクレオチド(S

3) へ対結合できる。例えば、チオール標識DNAが製造でき、チオール基はMirkin et al., Nature 382: 607-609 (1996)、Elghanian et al., Science 277: 1078-1081 (1997)、Storhoff et al., J. Am. Chem. Soc. 120: 1959-1964 (1998)、Storhoff and Mirkin, Chem. Rev. 99: 1849-1862 (1999) およびMucic et al., J. Am. Chem. Soc. 120: 12674-12675 (1998) (各々の全体が参照文献として本明細書へ組み入れられる)、に記載されているようにAuへのDNAのカップリングに働くことができる。もしくは、ビオチニル化DNAが製造でき、続いて、ストレプトアビジン: Au対結合体へ対結合される。実施例3はそのような対結合体製造のための詳細なプロトコールを提供している。いくつかの態様において、SPR基体はメルカプトヘキサノールで処理され、それは物理吸着を減少させることにより、固定化されたプローブDNAが“起立”するのを助けている。

【0062】

図13は前記のアッセイ形式を使用して得られたSPRプロフィールの例を示している。この例において、標的(S2)は24-merオリゴヌクレオチドである。S1およびS3: Auは12merプローブオリゴヌクレオチドであり、その各々はS2の半分の一つと相補的である。S1は5'アミン基を持ち、それを通じて前記のようにAuフィルムへ固定化されている。S3は3'チオール基を持ち、それにコロイド状Auが付着される。S1、S2およびS3は以下の配列を持っている：

5' -H₂N-C₆H₁₂-CGC ATT CAG GAT-3' S1

5' -TAC CAG TTG AGA ATC CTG AAT GCG- 3' S2

5' -TCT CAA CTC GTA-C₆H₁₂-SH-3' S3

図13の線Aは、他の試薬不在下でのS1対結合AuフィルムのSPR応答を示している。線BはS3: Au不在下でのS2へのS1のハイブリダイゼーションは、SPR反射能最小の非常に小さな置換(0.1°)しか導かないことを示している。線CはS3: Au対結合体が加えられた場合、明白なプラズモン角シフ

トがあることを示しており、それはS 3 : A u不在下で観察された応答と比較して、約18倍増加したS P R応答に相当している。

【0063】

ある種の好適な態様において、A uフィルムは前記のように、A uフィルムおよびコロイド状A u間のカップリング距離を最適化するためにスペーサーがかぶせられる。好適なスペーサーはS i O₂層である。

【0064】

A u-コロイドS P R促進方法論の応用を、前記のプローブ形態でのD N A検出アッセイに限定する必要がないことが理解されるであろう。二つの中心要素：

(1) 問題とする標的D N A配列の一部と配列が相補的である固定化プローブ(またはプローブ類)；および(2) 固定化プローブと直接的かまたは間接的に会合することになる分子へ対結合された検出可能タグ、に頼る特異的D N A配列検出のためには多くのアッセイ形式が存在することが本分野では知られている。これら二つの要素に頼る任意のアッセイ形式での標的核酸配列のS P R検出を可能にするため、当業者は本発明の方法を容易に適合できることが理解されるであろう。さらに、同一の方法論が、プローブおよび／または標的が他の核酸(例えば、R N A)、核酸類似体(例えば、ペプチド核酸)またはそれらの組み合わせから成っている形態に応用できる。

【0065】

S P Rに基づいたアッセイの独特な特性の一つは、結合データが反応の進行をモニターするためにリアルタイムで獲得できることである。図13の挿入図は、時間の関数として、固定した入射角(53.2°)でS P R反射能をモニタリングすることによる、第二のハイブリダイゼーション工程(即ち、表面拘束オリゴヌクレオチドへのプローブ：A u対結合体結合)の反応速度論的プロットを示している。予想されるように、信号変化は最初の5分で劇的であり、ハイブリダイゼーション過程は60分後にはほとんど完了している。

【0066】

A uフィルムのS P R応答の変化は、D N A“融解”(即ち、基体を加熱することによる脱ハイブリダイゼーション)、またはA uナノ粒子を放出する部位で

の三連複合体のDNA消化により逆転できる。再び、融解およびDNA消化は速度論的データを得るためにリアルタイムでモニターできる。DNA融解研究の場合において、パルスまたは連続的レーザー照射により誘導される金属フィルムでの正確な温度変化が正確に計算できる。単一ヌクレオチド多形(SNP)の検出、それに対するハイブリダイゼーション/脱ハイブリダイゼーション熱力学および速度論は高度に温度感受性である、はAuフィルム表面上の正確なレーザー誘導温度変化に対応したAuフィルムのSPR応答のモニタリングにより達成できる。DNA消化の場合、表面拘束オリゴヌクレオチド/プローブ: Au複合体の切断一本鎖かまたは二本鎖領域は、結合されたコロイド金が放出されるので、プラズモン角のシフトとして観察されるであろう。

【0067】

上で議論したように、走査型SPRを使用する本発明に方法は、45nm直径Au—コロイドナノ粒子に対して 3×10^6 粒子/cm²未満での検出を可能にする。もし各々の粒子が上記のように核酸プローブへ対結合されていたら、 3×10^6 標的核酸コピー/cm²を検出することが可能である。DNAハイブリダイゼーションアッセイはBawtell, Nat. Genet. Suppl. 2 : 20-24 (1999) (全体が参照文献として本明細書へ組み入れられる)に記載されているように、通常約50μm直径の試薬スポットを使用するマイクロアレイ形式で実施される。50μmのスポットサイズを仮定すると、本明細書で提供されたAu—コロイドSPR促進法は60コピーほどの少ない標的核酸を検出できることを意味している。 > 45 nm直径のより大きなAuコロイドナノ粒子を使用したさらに低いレベルが期待できる。このレベルの感度は本分野では先例がない。ここに提供された方法は、PCRを使用しないハイブリダイゼーションバイオセンサーおよび一般的なDNA診断のための新しい機会を提供する。

イメージングSPRおよびマイクロアレイアッセイ

イメージングSPRの技術が、Auフィルムに基づいたSPR基体上のDNAプローブマイクロアレイのようなマイクロアレイへの検体の結合をモニターするため、いくつかの態様において使用される。通常の走査型SPRにおいては、S

PRが起こる角度範囲内で入射角を変化させてSPR反射能を測定する。このため、各々の入射角で全SPR基体SPR反射能の一個の測定値が得られる。対照的に、イメージングSPR態様においては、固定された入射角が使用され、全内部反射を受ける光が、好適には電荷結合素子(CCD)の表面上にイメージされる。得られたイメージは空間的にSPR反射能変化を描いている。SPR反射能の変化は、SPR基体表面付近の屈折率の局在化変化により生じる；これらの後者の変化は順にSPR基体表面での物質の吸着または脱離から生じる。この故、反射率イメージは、そのような吸着または脱離が起こったSPR基体上の部位を明らかにする。

【0068】

好適な態様において、前記のコロイド状Au試薬がイメージングSPRの対比剤として使用される。イメージは好適には、Auフィルムへのコロイド状Auタグ付き試薬の結合により、反射能の最も大きな増加が観察される角度で捕捉される。得られたイメージにおいて、最も高い強度の領域は、反射能に最も大きな増加を受けた、およびそれ故、最も多い量のコロイド状Auが結合されたAuフィルムの範囲を表している。前記のように、最大反射能変化の角度（反射能の最大増加および最大減少）は、コロイド状AuがAuフィルムへ結合した場合に得られるSPRプロフィールから“裸の”Auフィルム（即ち、結合されたコロイドなしの）のSPRプロフィールを差し引くことにより容易に決定できる。

【0069】

好適な態様において、CCDカメラが“裸の”Auフィルムが反射率イメージで黒に見えるように配置される。この方法で、反射率の変化がAuフィルムの“バックグラウンド”反射率より高く容易に観察できる。

【0070】

好適な態様において、SPR基体は、コロイド状Au吸着により観察される反射率が最大に増加する入射角でイメージされる。しかしながら、コロイド状Au吸着により観察される反射率が最大に減少する入射角でもイメージできることが明らかになるであろう。

【0071】

イメージングSPRは多数の分離したAuフィルム領域の反射率データを同時に与えるので、この技術は実施されるべきSPRに基づいたマイクロアレイアッセイを可能にする。これらの態様において、試薬-抗体、DNAプローブなどのようなものはAuフィルムの特異的な分離された領域に局在化されている。好適な態様において、異なった試薬が各々の分離された領域に固定化されている。固体支持体上にこのような様式で生体分子をアレイ化する方法は本分野ではよく知られている。問題とする標的を含んでいると疑われる液体は続いて、前記のようにAuフィルム、並びにコロイド状Au対結合化試薬と接触させる。Auフィルムは次にイメージングSPR装置を使用してイメージ化される。Auフィルム上の各々の領域での規格化反射率強度は、それに結合されている標的の量を明らかにする；反射率信号の位置は標的の同一性を明らかにする。この方法において、多数の標的を同時に定量することが可能である。さらに、本発明の方法を使用して、多数の標的（例えば、DNA多形）の速度論的データを同時に得ることも可能である。

【0072】

本発明のいくつかの態様において、アッセイは一つ以上のサイズコロイド状Auナノ粒子の混合物を使用して実施される。ナノ粒子サイズで最大反射率変化の角度が変わるので、そのような態様においては、一つ以上の入射角でSPR基体をイメージすることが必要である。例えば、50nm厚Auフィルムを使用すると、10nmコロイド状AuがAuフィルムに局在化されるようになった場合、70°で大きな反射率変化が観察されるが、35nm Auコロイドがフィルムに局在化されるようになった場合、この角度では何の変化も観察されない。しかしながら、もし入射角度が73°に上げられたなら、35nm Auコロイドで大きな反射率増加が観察されるが、10nm Auコロイドでは観察されなかった。それ故、両方の角度での測定が存在する各々の粒子型の量を決定するために使用される。

【0073】

好適な態様において、イメージングSPR装置は、SPR基体が水平に配向するように使用される。このことはプリズム底面を直立させて水平面に面するよう

に置くことにより可能である。S P R 基体はプリズム底面の上部に置くことができ、例えば、浸漬油の一滴を使用して光学的にプリズムと連結する。特に好適な態様において、入射角の調節に適応させるため、プリズムは回転台に乗せられる。

【0074】

本発明により提供される水平プリズムの幾何学的配置は、本分野のS P R 装置に二つの著しい改良を可能にする。第一に、レーザー台と平行なS P R 基体の位置取りは（即ち、水平で、顔が上を向いた方向付け）、試料表面への溶液および試薬の迅速で平行した導入を可能にする。実際、非常に単純な実験が、試料の小滴に含まれた、すべての溶液化学により実施される。溶液が基体へ流し込まれなければならなかった従来の技術の垂直な試料の位置取りと反対に、液体試薬はまたこの幾何学配置ではロボット的に導入される。第二に、液体の導入のための複雑なフローセルがなく、イメージを取得するためにはプリズムの頂上に試料を置くだけである。この配置では、基体は連続的様式で迅速に調べることができ、96 ウエルがプレートリーダーに導入されるのと同じ様式である。従って、従来の技術の垂直試料配向よりもこの水平配置では基体のロボット的導入の可能性が非常に高い。

【0075】

図14は上に概説したイメージングS P R 配置の好適な態様の正面透視図を説明している。装置は光学台13に乗せられている。励起源1は好適にはレーザー、より好適には1mW HeNeレーザー(632.8nm、500:1偏光)または多波長励起が可能なAr⁺/Kr⁺レーザーである。レーザー光は中性密度フィルター2を通過し、続いて線形偏光子3を通過してさらに偏光吸光度を増加する。偏光は水平面に関して平行であり、それ故、水平に配向されたプリズム/試料集合体8でp偏光される。二つの鏡4および5は、光学台13表面から空間フィルター6内へ、光線を上向きに向けている（好適には20°の角度で）。空間フィルター6は光線を広げ、その点で光線の中心は平凸レンズ7により平行にされる。空間フィルター6は好適には5μmの小さな穴を持つ60X顕微鏡対物レンズから成り、好適には光線を~4.5インチの直径に広げている。平凸レン

ズ7は、好適には広げられた光線を3インチの直径に平行化する。この劇的な光線拡大は、非常にわずかな空間的強度のゆらぎしか持たない波動前部で試料を照射することを可能にすることに注目するのは重要である。このことで獲得されたイメージにおける、潜在的なバックグラウンド差し引きの曖昧さを避けている。

【0076】

平行化された光線はレンズ7を去り、プリズム／試料集合体8へ入る。 20° 上向き光線角度はプリズム／試料集合体8で 70° の入射角を提供し、それは薄いAuフィルムの高コントラストSPRイメージングに最適である。好適な態様において、プリズム／試料集合体は、その底面が光学台13と平行および離れて向き合っているように位置している $70^{\circ} - 70^{\circ} - 40^{\circ}$ プリズムから成っている。SPR基体（好適には、顕微鏡スライド上に蒸着された50-nm-厚Auフィルムから成っている）は浸漬油の小滴でプリズム底面と光学的に調和させる。試料保持器の粗い位置取りはプリズム／試料集合体8を垂直に据えつけられたレール上で滑らせることにより達成され、一方、微圧力調節はマイクロメーター作動移動台で行われた。拡大された光線の減弱化全内部反射が起り、装置の採取部への、下に向けた光線の通過が生じる。この鋭くないイメージング角度では、反射した光線は図14に示されているようにほとんど一次元に押し縮められる。これは1対の半円筒形平凸レンズ10および11によるイメージの再拡大および平行化により補正される。光線は次に電荷結合素子（CCD）カメラ12に再び焦点をあわせ、採取される。

【0077】

光線は鏡4および5により表面光学台13から上に向けて偏向されるので、図14の光学要素5から12は、好適には強固な構造を提供するため、高安定性レールシステム上に乗せられる。好適な態様において、鏡4および5およびレールシステムは全有用SPR範囲（即ち、約 45° から約 80° ）にわたって、入射および採取角を変化させるように調整できる。

【0078】

イメージングSPR装置は一般的に走査型SPR装置よりも感度が悪いと考えられている。しかしながら、本発明のイメージングSPR装置およびAu-コロ

イド (12 nm) 促進法を使用すると、5桁より大きなダイナミックレンジで、多スポットアレイ中、約 8×10^7 オリゴヌクレオチド/ cm^2 の信頼できる検出を可能にする。この結果は、ハイブリダイゼーション効率を最適化することなく得られており、Au-コロイド促進がない走査型SPR装置の文献で提供されている値と比較すると、2から4桁の感度の改良を示している。Auコロイド促進を持つマイクロアレイ走査型SPRの非最適化感度は、少なくとも、マイクロアレイにおける標的DNA配列検出のための、通常の発蛍光団に基づいた方法の感度と少なくとも同等である。しかしながら、本発明の装置、方法および試薬の使用は発蛍光団に基づいたシステムを上回る感度を提供するであろう。Auコロイド選択（例えば、サイズ、形状、組成その他）およびハイブリダイゼーションプロトコール（例えば、プローブ、アニーリング条件その他）の改良の最適化は、当業者の通常の仕事であろう。

【0079】

表面プラズモンを作り出すための幾何的形状および方法において著しい改良があった。これらの態様のいくつかの実施に向けられた本発明の態様が以下に説明されている。

【0080】

単純SPR干渉計が文献に記載されている。例えば、Kabashin and Nikitinの仕事において、光線はKretschmann型配置表面プラズモン励起に先立って分配され、反射光と再び合体される。Kabashin and Nikitin. Opt. Comm. 150: 5-8 (1998)。生じた干渉パターンはCCDを用いてイメージ化される。43.7°の共鳴角において、検出できた屈折率の最小変化は $\Delta n = 4 \times 10^{-8}$ であり、角度のシフトの測定により検出できるものより2桁低かった。本発明の一つの態様において、測定は12-nm直径コロイド状Au增幅を使用して実施でき、Auの被度は角度のシフトで検出するには低すぎたが（AFMデータに基づくと明らかに存在している）、干渉法的には検出できる。検出できるほどの散乱は、小さなナノ粒子のそのような低い被度では期待されない。

【0081】

本発明の別の態様において、コロイド状Au—増幅SPRの感度は“劣った光子結晶”の使用により改良される。光子結晶はある種の波長では完全に不透明であり、他では完全に透過性の物質である。表面プラズモンは薄いAgフィルム中の副波長ホールアレイを通した光学的透過を促進することが示されている。二つの異常な効果が観察されている：第一に、光子バンド—ギャップ物質で予測されるような、明確な透過極小および極大が存在する。第二に、ホールを通った透過は、標準穴理論により予測されるよりも1000倍多い。このことはホールでの光の流れが表面プラズモンとのカップリングにより促進されていることを示している。本発明はホールおよびホール内部の金属ナノ粒子間の促進されたカップリングを利用する。それを行うには、ホール(100nm直径)のアレイを持つガラス上の薄いAgフィルムが文献に記載されているように調製される。Ag表面は次に、ホールの下のガラスが捕捉抗体で選択的に誘導化されるのを可能にするため、有機チオールSAMで被覆する。続いて、コロイド状Au粒子でタグ付けされた第二抗体で、サンドイッチタイムノアッセイが実施される。コロイド状Au粒子の導入は、ホールのアレイの光学的特性に大きな変化を導いた（例えば、反射能、透過率）。ホールをほとんど埋めるような、粒子の電気的ではない成長でより大きな変化が観察される。フィルムは有機チオールSAMで被覆されているので、金属は粒子状でのみ成長するであろう。

【0082】

本発明の別の態様において、 2π にわたるコロイド状Au—SPR散乱および角度の関数としての反射率の同時測定が可能である。CCDは回転台に乗せられ、半球形プリズムとともに移動でき、すべての角度で散乱光が測定できる。その結果、各々の反射能データポイントに対する全散乱イメージが存在する。三つのデータ特性が重要である。第一に、フォトダイオードは散乱されたおよび反射された光の両方を集めるので、与えられた入射角で、CCDに到達している散乱強度の測定は、散乱されたおよび反射された光を区別することを可能にする。散乱および反射成分の両方を示す、固定化された大きな粒子を持つ表面でのSPR反射能を理解するには、これは必須の前必要条件である。第二に、散乱イメージそれ自身、表面に結合されたコロイド状Auナノ粒子のサイズを決定するため、な

らびに結合されている粒子の数を定量するために使用される。第三に、散乱には角度依存性および空間的分布が存在する。流離サイズおよびレーザー励起角の両方が、散乱強度に大いに強い影響を与える。

Auフィルムの湿式化学合成

高スループットSPR基体作製のための、特異的な薄さの蒸着されたAuに対する要求には著しい障壁が存在する。この問題を処理するため、本発明は薄いAuフィルムを得るための迅速な湿式一化学的方法を提供する。本方法は“播種”機構を使用する。好適な態様において、前もって形成されているコロイド状Au粒子の自己集合単一層上、水性溶液からのAu³⁺イオンの選択的還元により、種をまかれたフィルムが製造される。薄いAuフィルムの湿式化学“播種”的の詳細なプロトコールは実施例4に提供されている。

PDMSマイクロウェルアッセイ

同一表面上での多数の化学をすばやく処理するため、各々の独特の化学的相互作用を物理的に分離し、各々の問い合わせを個別にできるための方法が必要とされている。本発明の一つの態様は、ポリマー性で、均等に分布したマイクロウェルアレイの製作および実施に関するものである。ウェルのアレイは生物適合性で、非常な融通性であり、非常に低い化学反応性しか持っていない、接着剤なしで任意の基質に結合でき、安価に製作され、容易に入手可能な物質である。これらの特性はアレイ化化学の実施および分析においてアレイを非常に融通性のある道具にし、表面プラズモン共鳴(SPR)による多表面化学の同時分析の実施可能にしている。そのようなマイクロウェルアレイは紫外-可視分光法(UV-vis)、表面促進ラマン散乱(SERS)および他の表面感受性分析技術による分析にも有用である。

【0083】

最近、化学において道具としての使用が著しく増加してきた。高スループットスクリーニングにおける、コンビナトリアル化学およびその応用の急速に増大している使用は化学におけるアレイ使用の大多数を説明している。コンビナトリアル化学は薬剤および無機化合物発見および新規物質合成のような多様な化学領域で利用されている。アレイもまた、化学混合物中の別個の化合物の分析を実施す

るためのセンサーとして使用されることが増大しており、独特の化合物を検出するためには各々個々のセンサーが使用される。もしくは、個々のセンサーをセンサーアレイ中で他のものと合同させ、処理される試料中の成分のライブラリーを形成させる。マイクロチップ上に配列されたキャピラリー電気泳動カラムは分析技術へのアレイ適応の例である。

【0084】

ポリジメチルシロキサン (PDMS) は、マイクロウェルアレイに望ましい特性を持っている、市販品として入手可能で、安価なポリマーである。PDMSの生物適合性は、移植植物、人工関節、コンタクトレンズおよび血管および皮膚移植片のような医学使用にそれを理想的なものにしている。工業的応用には、電気被覆、絶縁体、消泡剤、カーボンペースト電極の媒質、微細機械加工、および微量接触印刷 (pCP) による微細制作およびキャピラリー中の微細成形 (MIMI C) が含まれる。本発明のPDMSマイクロウェルアレイの製作は、中心に0.046インチの直径の穴を0.092インチの間隔で持つ正方形パターンで電気プレッドボードの区分を切断することから始まる。PDMSプレポリマーをプレッドボード型に流し込み、プラスチックペトリ皿中でプレポリマーを放置して硬化させる。PDMS-プレッドボード複合物をペトリ皿から取りだし、構成部品を手で分離する。このスケールのアレイの再現での一つの可能性のある問題は、いくつかのポストがアレイの残りから分離されることである。これを防ぐには、はく離剤 (例えば、Dow Corning 230液) の光コーティングがプレッドボード型に使用できる。加えて、ポリマーの薄層は型の裏側で硬化され、安全カミソリ刃で容易に削りとることができる。PDMS “ポストアレイ” は次に型として使用される。再び、型はペトリ皿中におろされ (ポストが下) 、PDMSを上に注ぐ。ポスト上部とペトリ皿表面の適切な接触を確かにするため型に重しを乗せる。再びプレポリマーを硬化させる。PDMS “サンドイッチ” をペトリ皿から除き、分離する。新しいマイクロウェルアレイは次に石鹼水、続いてメタノール中で、各々10分間超音波処理する。図17は各々の成形工程の結果を示している。

【0085】

接着試験がガラス、ドープシリコン、ポリカーボネートおよびガラスに蒸着した金で実施された。ウェルアレイは手でそれらを表面に押しつけ、静電的接着を起こすことにより清浄な基質へ付着した。指定されたウェルは次にピペットを用いて0.01Mプロモクレゾールブルー水溶液を満たした。接着安定性が10、20、60および720分間隔で記録された。720分後でさえも、与えられた表面に結合しており、プロモクレゾールブルー漏出の証拠はどの基質でも観察されなかった（図18）。

【0086】

ウェルアレイマスターは顕著な完全性を示し、いくつかのポストマスターがウェルアレイを複製するために多数回使用されたが、外観上、構造欠陥は増加しなかった。ポストマスターがいくつかの異なったサイズおよびパターンで複製されたが、同じように成功し、欠陥は現れなかった。穴サイズは0.001インチから0.5インチ、好適には0.025インチから0.1インチの直径範囲であり、穴密度は平方インチ当たり400までである。ウェルアレイはお互いの上に重ねることができ、より長いポストを持つポストマスターを形成させるために使用でき、それからはより深いウェルを持つアレイが続いて製造される。色素を硬化前にエラストマー内へ導入してもよく、着色したウェルアレイが製造される。着色アレイの使用は、迷光および反射光を削減し、それ故、光源が個々のウェルを通して照射されている場合の分析により有効である。

【0087】

本発明のPDMSウェル基質は、基質上で個々の化学を物理的に分離する容易な製作および実施法として働く。これらのウェルの各々は個々に処理でき、交叉汚染なしで表面化学相互作用を分析できる。従って、これらのアレイは容易に実質上任意の表面分析技術に適応できる。

バックグラウンド信号の減少

S P R測定における主たるノイズ源はバックグラウンド信号、即ち、コロイド状A uの非特異的結合である。コロイド試薬の質をさらに改良する一つの方法は、HS (CH₂)₁₅CO₂H (10%) およびHS (CH₂)₁₀CH₂OH (90%) の混合物（基体を被覆するために使用されたチオールと同一の組成）から形成

されたSAMによるAuナノ粒子の被覆を含んでいる。粒子上のカルボン酸は多くの炭素により突き出されるであろうので、EDCにより容易に活性化できるが、表面上のアルコールの大きな重量は非特異的結合を排除するであろう。また、適したカルボン酸の希釈により、利用可能な生体分子結合部位の数を調節することが可能である。加えて、時間による生体分子：コロイド状Au対結合体量の変化の可能性を回避するため、生体分子：粒子プローブは凍結乾燥される。

【0088】

特にDNAハイブリダイゼーション実験において、非特異的結合を減少させる他の手段には：温度の制御、非相補的配列の添加、塩濃度の調節、および表面オリゴへのハイブリダイゼーション間のDNA：Au対結合体の溶液濃度を減少させることが含まれる。さらに非特異性を減少させるため、DNAおよび表面間により長いリンカーを、コロイド状Au粒子上およびAuフィルム上の両方に使用してもよい。加えて、ポリエチレングリコール部分がカルボキシル基SAMへ共有結合で結合できる。

二次増幅による感度の増加

反射能におけるAuナノ粒子—媒介変化の程度を増加させることは、信号の直接的増幅により達成されるであろう。このことは、結合反応を経てSPRフィルムの近傍へ持ち込まれる、コロイド状Auナノ粒子のサイズを増加させることにより行われる。Au³⁺およびAg⁺の両方（および適切な還元剤）を使用して、固定化コロイド状Auナノ粒子を成長させるいくつかの異なった方法が示されている。

【0089】

直接増幅する別 の方法は、粒子結合カスケードを使用することであり、そこでは、単一粒子の結合が、特異的核酸（例えば、DNA）相互作用を経て、続いての粒子結合の引き金になる。一つの例において、コロイド状Au “検出粒子”（DP）が問題とする抗原を認識するモノクローナル抗体および30—塩基一本鎖DNAオリゴヌクレオチド（A）の両方で被覆される。二つの一本鎖オリゴヌクレオチド（A' およびB' ）で被覆された金コロイドから成る第一の増幅粒子（AP-1）も製造され（例えば、ストレプトアビシン：Auヘビオチニル化オリ

ゴの混合物を添加することにより)、ここでA'は検出粒子上のオリゴヌクレオチドと全く相補的であり、一方、B'は全く非相補的である。捕捉抗体への抗原の結合はDPの結合を導く。溶液内への続いてのAP-1の導入は、多AP-1粒子のDPへの結合を生じる。B' と相補的である一本鎖オリゴヌクレオチド(B)で被覆した第二の増幅粒子(AP-2)が次に導入され、それはAP-1粒子への多AP-2粒子の結合を生じる。実際、このカスケードスキームは追加の粒子を含むように拡大される。

【0090】

反射能および散乱v.s. 粒子サイズの非線形的応答は増幅が同様に非線形であることを意味していることに注目するのは重要である：非常に密接して結合されている3つの粒子が光学的に单一の大きな粒子のように挙動すると、3つの単離された小さな粒子の結合で観察される変化よりも遙かに大きな変化を生じるであろう。さらに、单一の結合された粒子へ結合するように粒子のネットワークを誘導するのは可能であるが、そのようなネットワークは、DPそれ自身ではネットワーク形成を誘導できないので、DPへの結合に先立ってネットワークが必然的に存在していなければならない。DP、AP-1またはAP-2の非特異的結合は存在しないことが必須であるので、ナノ粒子のカスケードが連続的に構築される方法は、凝集体の非特異的結合を除去するための課題としては好適である。

【0091】

増幅粒子の連続的添加を必要としない別のカスケードスキームを使用してもよい。このことは、増幅粒子へ結合されるオリゴヌクレオチドを、お互いに相補的ではないが、核酸(例えば、DNA)の別一本鎖セグメントと相補的であるように設計することにより達成される。この相補的オリゴヌクレオチドは、増幅粒子の結合を生じるカスケードを活性化するために溶液内へ導入することができる。例えば、AP-1はお互いにまたはA(DP上に被覆される)と相補的ではない一本鎖オリゴヌクレオチドBおよびCで被覆される。上記のように、捕捉抗体への抗原の結合はDPの結合を生じるであろう。しかしながら、溶液中に存在するAP-1は、一本鎖オリゴヌクレオチドA' B' (オリゴAおよびBと相補的)が導入されるまではDPへ結合しないであろう。従って、AP-2(これもま

た溶液中に存在する）、一本鎖オリゴヌクレオチドDで被覆されている、も一本鎖オリゴヌクレオチドC' D'（オリゴCおよびDと相補的）が導入されるまではD Pへ結合しないであろう。上のように、このカスケードスキームは追加の増幅粒子の添加を含むように拡大される。この別のスキームの利点は、增幅粒子は連続的に加える必要なないことであり、最初から溶液に存在していてもよい。

コンビナトリアルライブラリーの高スループットスクリーニング

本発明の一つの態様において、粒子一促進SPRが小さな分子のライブラリーのための高スループットアッセイに使用される。薬剤送達のコンビナトリアル化学の範例は、現在、機能性アッセイの設計が律速である状況を作り出しており、あるとしても、非常に少ない一般的な応用可能な解決法しか提供されていない。 SPRの単純性、およびイメージング様式を使用する能力は、SPRを優れた選択にしている。

【0092】

高スループット応用はSPR測定により高い部位密度を要求する。PDMSマイクロウェルアレイ（平方インチ当たり >100 の“ピーカー”密度）はそのような高密度の部位を提供する。そのような少量の反復ピペッティングは手で行うのは不都合（または不可能）であるので、アレイヤーロボットの使用により達成される。本方法は、HS (CH_2)₁₁CO₂Hの小さなスポットを置くためにロボットの8つの分配針を使用する。この分子は基質上の分離した位置（即ち、分配針が非常に近くにくる所）でSAMを形成する。基質の残りはHS (CH_2)₁₅CH₃で満たし各々の（親水性）スポットの周りに疎水性環境を作り出す。アレイヤーロボットが水性溶液を分配した場合、それは親水性パッチ上に小滴を形成し、それは高部位密度で働くために必要な境界を提供する。別の解決法は、それらと類似の形状を形作るための（しかし先端部分は大きい）ロボットの分配針を使用することであり、それは溶媒で満たすことができる。

実施例1

蒸着AuフィルムおよびAuコロイドの製造

以下の材料および方法が図1-5に示されたデータを得るために使用された。

【0093】

<12 nmの直径のAuコロイドはGrabar et al., J. Am. Chem. 67: 735-743 (1995) およびGrabar et al., J. Am. Chem. Soc. 118: 1148-1153 (1996) (各々の全体が参考文献として本明細書へ組み入れられる)、に記載されているように、HAuCl₄・3H₂Oのクエン酸還元により製造された。

【0094】

>12 nmの直径のAuコロイドは“種コロイド”技術を改良して製造された。1mL中の12 nmコロイド（長軸12 nm±2 nmおよび短軸11 nm±1 nm、758粒子のサイズ分けから）とともに、100 mL、0.01% HAuCl₄および500 mLの38.8 mMクエン酸溶液、が出発材料として使用された。得られた試料は透過型電子顕微鏡（TEM）により分析され、試料とされた274粒子から、45 nm±5 nmの長軸および37 nm±4 nmの短軸が示された。100 mLの0.02% HAuCl₄および1.0 mLの38.8 mMクエン酸溶液を使用して製造された、大きなコロイドの第二のバッチは、424粒子から、59 nm±14 nmの長軸および52 nm±11 nmの短軸が示された。同様のプロトコールから以下の次元を持つ粒子のバッチが製造された：373粒子のサイズ分けから30 nm±3 nm（長軸）×25 nm±2 nm（短軸）、および112粒子のサイズ分けから35 nm±3 nm（長軸）×30 nm±3 nm（短軸）。これらの製造は100 mLの0.01% HAuCl₄および500 mLの38.8 mMクエン酸溶液が使用され、3 mLおよび2 mLの直径12 nmのコロイド状“種”が各々加えられた。平均粒子直径および標準偏差はNIH Image:v. 1.62ソフトウェアを使用するTEM Imageの粒子サイズ分析により決定された。

【0095】

薄い(47-50 nm) Auフィルムは、拡散ポンプで吸引したEdwards Auto 306薄フィルム製作システム中、抵抗性加熱モリブデン舟形の容器(Kurt. J. Lesker)からのAuショット(99.99%, Johnson Matthey)の熱蒸発により製造された。蒸発基質は1インチ×1インチ×0.02インチ、ガラスへのAuの吸着を増加させるため、10% (

v/v) (3-メルカプトプロピオニル) -トリメトキシシラン/CH₃OH溶液に30分暴露された研磨SF11ガラス (n=1.78, Schott Glass Technologies) 片であった。Auは均質な被覆を確実にするために0.5nm/sで試料を一定に回転させ、1×10⁻⁶ミリバールの圧力で被覆された。蒸発後、蒸着した層の表面のざらつきを減少させるため、一定流量のアルゴン下、自家製オープン中、300℃で5-10分間フィルムを焼きなました。

【0096】

焼きなましたAuフィルムはアルカンチオール(2-メルカプトエチルアミン(MEA)または3-メルカプトプロピオン酸(MPA))の10mMエタノール溶液で30分修飾した。より長い浸漬時間は、続いての誘導体化工程の効率または密度を目立つほど改良しなかった。コロイド状Auのアミン修飾(MEA被覆)表面への固定化は、室温にて、非希釈水性溶液で実施された。アミン修飾表面は、アミン窒素の不対電子の利用可能性、ならびに陰性に荷電した粒子とのイオン的相互作用のため、コロイド状Au粒子の強い吸着を誘導した。

【0097】

SPRデータは走査型SPR装置を使用して得られた。表面プラズモンの励起はKretschmann型配置を使用して達成され、ここで1インチの直径の半球形プリズム(SF11ガラス, Eisco Products)はAuが前に説明したように蒸着されているSF11基質と屈折率整合された(Cargille Inc. 浸漬油 n=1.78)。この集合体は次にAuフィルムが溶液に暴露される自家製フローセル(容量~100mL)へ加えられた。SPR励起源は円筒形5mW、500:1偏光吸光度HeNeレーザー(632.8nm, Melles Griot)であり、それは500:1可視-最適化線形偏光子(Newport 10LP-VIS)によりさらに偏光された。光学チョッパー(Stanford Research Systems)が光学信号を2kHzの周波数で変調するために使用され、それは次にロックイン増幅器(Stanford Research Systems, SR530)を経て検出と相関された。光線は100-mm焦点距離(f1)平凸(PCX)レンズにより焦点を合わせ

れ、25-mm f1 PCXレンズにより再び平行にされ、それにより光線サイズを0.4mm±0.1mmの直径に減少された。半球形レンズが次に、半球形プリズム／試料集合体により再平行化されるように、光線の焦点を合わせるために使用される。反射された光線は絞りを通過し、シリコンフォトダイオード検出器（Thor Labs）上で焦点を合わされ、それからの信号はロックイン增幅器で測定され、それは励起起源と同位相である。試料の角位置決めは、二つの高分解能（0.001°）サーボモーター－駆動回転台（Newport, RTM80CCおよびRTM160CC環状回転台）から成る自家製θ-2θ台により達成され、それらは回転軸が同一線上になるように一緒に取り付けられる。プリズム／試料／フローセル集合体が次に、Au／ガラス試料の中心が回転軸であるようにθ-2θ台に取り付けられる。台回転およびデータ収集はLabVIEW Wプログラミング言語を使用して開発されたコンピューターインターフェースを通して制御される（バージョン4.01, National Instruments）。典型的なSPRスキャンは0.1または0.01°分解能、0.5°s-1台回転速度、および0.3sのロックイン時定数、で行われる。

【0098】

粒子密度はタッピングモード原子間力顕微鏡（TM-AFM）を使用して決定され、イメージは1.5Hzの取得周波数および512のライン密度を持つタッピングモードで働いているDigital Instruments Nanoscope IIIAを使用して取得された。標準200nm蝕刻シリコンプローブが被度決定の目的に使用された。少なくとも4つのイメージが各々の試料の2つの異なる領域から得られた。表面被度が均一であることを確認するため、2つの $5\text{ }\mu\text{m} \times 5\text{ }\mu\text{m}$ イメージが~0.5mm離れてとられた。各々の位置において、より高分解能イメージを得るため、 $1\text{ }\mu\text{m} \times 1\text{ }\mu\text{m}$ スキャンがとられた。粒子計数は捕捉されたイメージから人力で行われた。報告された数字は、2から3イメージから得られた平均被度値である。

【0099】

すべての実験において、SPRおよびTM-AFT両方で、特定試料の同一領域を調べていることを確実にするための注意が払われた。従って、SPR実験の

間、照射された領域周辺でボックスにかき傷をつけた。その領域内での表面被度が次にAFMにより測定され、それにより、大きな規模にわたる同等ではない表面誘導による誤差を軽減した。溶液搅拌が粒子一直径－非依存性被度値を得ることにおいて重要な工程であることに注意するのは重要である。短い暴露時間(<1時間)および同一の溶液粒子濃度で、ほとんど等しい粒子表面濃度がコロイド直径に依存しないで得られる。このことは表面付着の拡散依存性を除去し、付着確率(粒子直径にほんのわずか影響される)を結果として生じた粒子数密度における決定因子として残している。

実施例2

サンドイッitimノアッセイ

以下の材料および方法が図6-10に示したデータを得るために使用された。

【0100】

AuフィルムおよびAuコロイドは前記のように製造された。ヒトIgG(h-IgG)、 γ -鎖特異的モノクローナルヤギ抗ヒトIgG抗体[a-h-IgG(γ)]およびFc特異的モノクローナルヤギ抗ヒト免疫グロブリンG抗体[a-h-IgG(Fc)]はSigma Immunochemicalsから入手された。

【0101】

蛋白質-Au対結合体は、a-h-IgG(Fc)を5mLのpH調整コロイドへ加え、続いて氷上で穏やかに搅拌しながら1時間のインキュベーションにより合成された。対結合体は1.5mL微量遠心分離チューブに1mL分画に分割し、12,500gで45分遠心分離した(Heraeus picoBiofuge)。透明からピンク色の上清を除き、軟ペレットはH2Oまたは40mMリン酸緩衝液(pH7.0)内へ~3の光学密度で再懸濁した。対結合体は2から8℃の間で、活性を失うことなく数日保存できる。

【0102】

フロキュレーションプロフィールは、Au粒子の外部を被覆するために必要な蛋白質量を決定するため、およびそれによりコロイド凝集阻害するため、a-h-IgG(Fc)-Auコロイド対結合体について構築された。溶液は、a-h-

-IgG (Fc) の 0.75 mg/mL 保存溶液の一部 (0 - 72 μg) を 6 μg づつ増加させて、0.1M NaOH を使用して pH 8.0 に調整した (EM Science カラー-pHast 指示小板、pH 2 - 9)、1.0 mL の 10 mm 直径コロイド溶液に加えた。試料は脱イオン H₂O で 1.150 mL に容量調整し、150 μL の 1.0M NaCl を各々に加えた。溶液を攪拌し、光学スペクトルを 10 分後に記録した。10 mm コロイドに対し、凝集を阻害するには 31.5 μg の a-h-IgG (Fc) / mL コロイドが決定された。

【0103】

a-h-IgG (γ) (および他の蛋白質) を Au フィルムに固定化するため、Au 表面上にカルボン酸基を導入するために前記のように MPA で Au 表面が修飾された。Au 表面での活性エステルの形成は、100 μL の 100 mM、pH 5.5、(1-エチル-3-(3-(ジメチルアミノ)プロピル)カルボージイミド塩酸塩 (EDC) 溶液をカルボキシル化 Au 表面と 15 分反応させることにより達成された。イミド部分の置換により反応性表面を安定化させるため、50 μL のスルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド (S-NHS) (40 mM、pH 7) が続いてフローセル内へ注入される。S-NHS と 15 分インキュベーション後、セルを 10 mL の緩衝液 (85 mM、リン酸、pH 7) ですすぎ、固定化されるべき蛋白質の 1.0 mg/mL 溶液を注入する。表面は蛋白質溶液と 30 分間インキュベートし、別の 10 mL のリン酸緩衝液で洗浄する。表面上の未反応部位はウシ血清アルブミンの 10 mg/mL 溶液と反応させることによりブロックする。さらに緩衝液で洗浄した後、免疫化学的反応を実施する；抗原および対結合体溶液に対する典型的インキュベーション時間は 5 から 30 分の範囲である。すべての SPR プロファイルは、蛋白質溶液間に存在するであろうわずかな屈折率相違を除去するため緩衝液中で、実施例 1 で説明したように得られた。

実施例 3

DNA 検出

以下の材料および方法が図 13 に示したデータを得るために使用された。

【0104】

クエン酸三ナトリウム二水和物、ポリ(エチレングリコール) ビス(3-アミ

ノプロピル) 終結 (PEG) 、16-メルカプトヘキサデカン酸 (90%) (MHA) 、3-メルカプトプロピオン酸 (MPA) 、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 、およびNaOHはAldrichから得られた。AuCl₄・3H₂OはAcrosから得られた。NaH₂PO₄、Na₂HPO₄、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS, 95%) 、NaCl、KC1、濃HC1、HNO₃、H₂S₄および30%H₂O₂はJ. T. Baker Inc. から購入された。3-メルカプトプロピルメチルジメトキシシラン (MPMDMS) および3-アミノプロピルトリメトキシシラン (APTMS) はUnited Chemical Technologiesから購入された。MgCl₂、スペクトル用CH₃COH、およびCH₃OCH₃はEM Scienceから得られた。CH₃CH₂OHはPharmcoから購入された。1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (EDC) 、N-ヒドロキシスルホスクシンイミド (NHS) およびストレプトアビシンはPierceから得られた。制限酵素HinfIはBiolabsから購入された。HPLC精製オリゴヌクレオチドはIntegrated DNA TechnologyまたはPennsylvania State University Nucleic Acid Facility (チャートI) から購入された。すべての試薬はさらに精製することなく、受け取ったままで使用された。使用されたH₂Oは蒸留され、続いてBarnstead Nanopureシステムを使用して精製された。ハイブリダイゼーション緩衝液は0.3M NaClを含む10mMリン酸 (pH 7.0) 緩衝液として調製された。10μM非相補的12-merオリゴヌクレオチドがブロッキング試薬として加えられた。25mMトリス-HCl (pH 7.8) 、100mM KC1、10mM MgCl₂が混合され、酵素緩衝液として使用された。蒸発に使用されたAu (99.99%) ショットおよびCrワイヤーはJohnson-Matthey Corp. から得られた。SF11ガラススライド (Schott Glass Technologies, n=1.78) はSPR走査実験に使用され、Fisher Pre-cleaned顕微鏡スライド (BK: 7, n=1.515) はイメージング実験に使用された。

DNA: Au対結合体製造。12-nm直径コロイド状Auは実施例1に説明したようにHAuCl₄・3H₂Oのクエン酸還元により製造された。平均粒子直径は透過型電子顕微鏡(TEM)で決定され、それは10%未満の標準偏差を示した。コロイド状Au溶液の光学スペクトルがHP8453分光光度計を使用して記録された。

【0106】

チオール標識DNA: Au対結合体はMirkin et al., Nature 382: 607-609 (1996)、Elghanian et al., Science 277: 1078-1081 (1997)、Storhoff et al., J. Am. Chem. Soc. 120: 1959-1964 (1998)、Storhoff & Mirkin, Chem. Rev. 99: 1849-1862 (1999) およびMucic et al., J. Am. Chem. Soc. 120: 12674-12675 (1998) (各々の全体が参考文献として本明細書へ組み入れられる) に記載されているプロトコールに従って製造された。36 μMの12-mer (100 μM) オリゴヌクレオチドプローブS3が1mlのAuコロイド溶液に加えられた。16時間放置後、溶液は0.1M NaCl溶液(pH7、10 mMリン酸緩衝液)中で2日間放置した。DNA: Au対結合体は過剰の試薬を除くため、遠心分離により(45分、12,500×g)洗浄した。上清は廃棄し、続いて赤色ペレットを0.1M NaCl溶液で洗浄した。2回目の遠心分離後、ペレットは0.3M NaCl/リン酸ハイブリダイゼーション溶液中に、本来の濃度で戻した。対結合体は調製したら新鮮な内に使用し、溶液濃度が一致していることを確かにするため光学スペクトルをいつも記録する。

【0107】

ビオチニル化DNA: Au対結合体は、ストレプトアビシン: Au対結合体から製造できる。H₂Oで1:1に希釈し、0.1M NaClでpH8.5に調整されたAu粒子の溶液を40RIの1mg/mlストレプトアビシン保存溶液に加えた。氷上で1時間インキュベートした後、非結合蛋白質を分離するために溶液を遠心分離した(12,500×g、45分)。200 μLのビオチニル化

オリゴプローブ ($10 \mu M$) を 30 分対結合体とインキュベートし、続いて、2 回目の遠心分離を行って上清を除き、ハイブリダイゼーション緩衝液へ再懸濁した。再び、チオール標識DNA対結合体で実施したように、溶液濃度の一致を確かにするために光学スペクトルがとられた。

【0108】

Auコロイドの表面上へのオリゴヌクレオチドプローブ取り込みの成功は、Mirkin et al., Nature 382:607-609 (1996)、Elghanian et al., Science 277:1078-1081 (1997)、Storhoff et al., J. Am. Chem. Soc. 120:1959-1964 (1998)、およびStorhoff & Mirkin. Chem. Rev. 99:1849-1862 (1999)（各々の全体が参考文献として本明細書へ組み入れられる）に記載されている方法を使用して確認された。簡単には、S3: Au対結合体溶液を S3 の二つの異なるコピーにハイブリダイズできる連結オリゴヌクレオチドと混合し、次に、連結オリゴヌクレオチドをモニターすることによりフロキュレーションが誘導された。混合物の光学スペクトルは 524 nm に Auコロイドの特徴的な吸収を示したが、連結オリゴヌクレオチドの添加は強度の著しい減少を伴った λ_{max} の赤色移動を導いた。このことはナノ粒子凝集体の形成によるものである。DNA二重体の融点の上まで徐々に溶液温度を上げていくことにより、脱ハイブリダイゼーションが起こり、コロイド状Auネットワークの解離を生じる。結果として、260 nm（溶液中での遊離オリゴヌクレオチドの特徴的吸収）での光学強度の増加が観察された。可逆的フロキュレーションを示さない DNA: Au対結合体はこの試験では廃棄された。

【0109】

表面は実施例1に詳述したように製造される。10 mM MHA/ C_2H_5OH 溶液に一夜浸漬することにより自己集合単一層が Au 表面に張り付けられた。標的 S2 の半分と相補的配列を持つアミン標識 12-mer オリゴヌクレオチド (S1) は EDC/NHS 架橋を経て表面上のカルボン酸基へ結合された。次に、未反応部位をブロックするためアミン標識PEG (1%) が導入され、続いて洗

淨、ハイブリダイゼーション緩衝液中での標的検体（24-mer DNA（S2））との2時間のインキュベーションを行った。非増幅実験において、S2の他の半分と相補的配列を持つタグ付けされていないDNAプローブ（S3）が加えられ、表面とインキュベートされた。增幅実験においては、SPR表面はAu粒子-タグ付けS3プローブが加えられ、表面とインキュベートした。両方の場合とも、ハイブリダイゼーションは1時間実施され、0.2% SDS / 0.1M NaClでよくすすぐれた。

【0110】

走査型SPRデータは実施例1で説明したような装置を使用してデータが集められた。ミニペリスタポンプ（Intech Laboratories, Inc.）が検体溶液の試料を0.1ml／分で試料セルへ送達するために使用された。1ml／分での5分間の洗浄がSPR測定値を集める前にいつも実施された。DNA融解、そこでは試料セルの温度は温かい脱ハイブリダイゼーション緩衝液（水浴で測定すると80℃）を20分流することにより上昇させた、を除いて、すべての実験は室温で完了した。液体送達装置における熱勾配のため、より高い温度、表面拘束DNA二重鎖の融点の27℃上、がここでは応用された。表面での実際の温度は60から70℃の間であると見積もられた。試料セルはSPR測定の前に室温まで冷却された。固定角（53.2°）で、インキュベーション時間の関数としてSPR反射能変化をモニターすることにより、速度論的研究が実施された。

【0111】

イメージングSPRは前に説明した装置を使用して実施された。データはSPR基体表面の空間的強度地図としてプロットされ、ここで強度の増加はSPR応答の増加を示している。空間的強度地図から各々の試料セルからの積算強度が計算され、ベースライン強度は差し引かれ、および各々の信号は試料セルの領域に對して規格化された。

【0112】

UV-VIS吸収分光法：UV-VISスペクトルがHP89090Aペルチエ温度調節器を備えたHP8453ダイオードアレイ分光光度計を使用して集め

られた。溶液温度を25-65°Cで変化させることにより(1°C/段階)、DNA融解アッセイが260nmでの光学強度変化をモニターすることにより試験された。ハイブリダイゼーション緩衝液が対照として使用された。

実施例4

薄いAuフィルムの湿式化学合成

ガラスカバーガラス($n = 1.515$, Fisher)を‘ピラニア’浴(30% H₂O₂が1:4の比で濃硫酸H₂SO₄と混合されている。その著しい酸化性のためこの溶液を取り扱うときは注意しなければならない)に沈めることにより洗浄した。清浄なガラススライドを、1-10mMのシランのエタノール溶液に暴露することにより自己集合した(3-メルカプトプロピル)メチルジメトキシシラン(MPMDM, United Chemical Technologies)で官能基化した。官能基化したスライドは、520nmで0.1AUの吸光度を与える表面被度が得られるまで12mm直径コロイド状Auの17nM溶液中に置いた。コロイド状Au-修飾表面は次に、500mLの0.5mM NH₂OH·HCl(Aldrich)水溶液中に置き、軌道振とう器上、150revs/分で搅拌しながら100mLの0.06%HAuCl₄(Acrros)を添加した。搅拌を20分間続けると、単一層上になめらかで、反射性のAu表面が生み出された。

実施例5

PDMSマイクロウェルアレイの合成

フィルム厚は実施例1で説明したように、標準200nm蝕刻シリコンプロープ、1.5Hzの取得周波数および512のライン密度を使用する、タッピングモード原子間力顕微鏡(TM-AFM)により表面上の刻みつけられたスポットでのステップ高を測定することにより決定された。

【0113】

PDMS(Dow Corning Sylgard 184、エラストマーと硬化剤の比が10:1)を混合し、真空デシケーターを使用して脱ガスし、および1インチ平方の電気プレッドボードマスター上へ注ぎ、小さなペトリ皿へ入れ、この複合物は真空デシケーターを使用して脱ガスし、50°Cのオープン中で

一夜硬化させた。冷却後、新P D M S “マスター”を電気プレッドボードからはがし取る。この新“マスター”はP D M Sの最終鋳型を形成させるために使用された。追加のP D M Sが新マスターおよびペトリ皿間に注がれ、脱ガスし、オープン中で一夜硬化させた。ペトリ皿底への一定の接触を確実にするために、ガラス顕微鏡スライドについているアルミニウムブロックを重りとして一番上に置く。このP D M Sサンドイッチをオープンから取り出し、冷却し、およびはがし取ってP D M Sレプリカをあらわにする。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は11 nm直径のコロイド状A uナノ粒子の吸着により生じる50 nm厚A uフィルムSPR基体のSPRプロフィールにおける変化を示している。

【図2】 図2はサイズ30 nm-59 nmのコロイド状A uナノ粒子の吸着により47 nm厚A uフィルムのSPRプロフィールがどのように変化するのかを示している。

【図3】 図3は35 nm(図3 A)および45 nm(図3 B)コロイド状A uナノ粒子の異なった表面被度でA uフィルムのSPRプロフィールがどのように変化するのかを示している。

【図4】 図4は図3で示されたデータに対する差SPRプロフィール(入射角対反射率のパーセンテージ変化(△))を示している。

【図5】 図5は30 nm-59 nmの直径のコロイド状A uナノ粒子に対する数密度の関数としての反射率の最大変化をプロットしている。

【図6】 図6はサンドイッチ イムノセンシング アッセイの例を図的に示している。

【図7】 図7は二次抗体(図7 A)およびコロイド状A uナノ粒子へ対結合された二次抗体を使用して得られたサンドイッチイムノアッセイSPRプロフィールを示している。

【図8】 図8は図7で示されたデータに対する差SPRプロフィール(△パーセント反射率対入射角)を示している。

【図9】 図9は非一対結合およびA u-一対結合二次抗体両方の固定化に対

する、反射率時間変化を示している。

【図10】 図10はイムノセンシングにおいて、種々の濃度の標的検体でのコロイド状Au誘導プラズモンシフトの変化を示している。

【図11】 図11はAuフィルムがSiO₂の15nm(図11A)、24nm(図11B)および33nm(図11C)薄層で被覆され、およびその上に吸着された12nmコロイド状Auを持つ場合に起こるSPR応答の漸進的促進を示している。

【図12】 図12は核酸ハイブリダイゼーションアッセイの例を図的に示している。

【図13】 図13は図12のスキームを使用して実施された核酸ハイブリダイゼーションアッセイのSPRプロファイルを示している。

【図14】 図14は本発明により提供されたイメージングSPR装置の例を図的に示している。

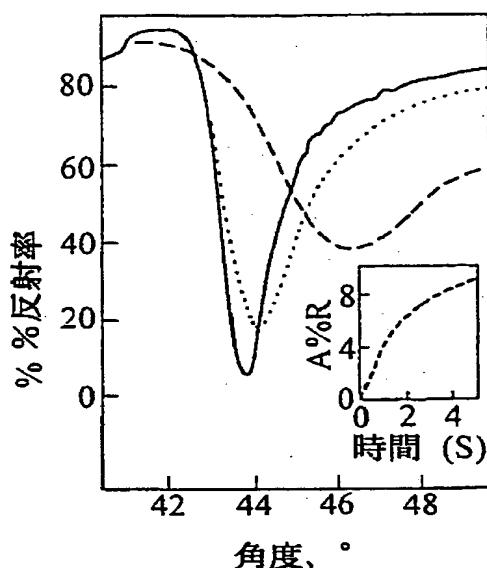
【図15】 図15Aは以下の修飾に対するSPR最小を示している、混合SAM(90%11-メルカプト-1-ウンデカノール:10%16-メルカプトヘキサデカン酸/Au:静電的に固定化されたプロテインA/抗IL-5複合体(a);0.6ng/mL IL5/25ng/mL HAS(b);IL1-5: Au(0.5%Blottブロックと)(c)。図15Bは同様の実験におけるSPR最小を示している、しかし、600ng/mL/25mg/mL HSAが導入されている。

【図16】 図16はNa2O3とHavC1yを異なった比:(a)1.3:1、(b)1.2:1、(c)1.4:1および(d)2.0:1、で混合することにより作製されたコロイド状分散液のUV-VISスペクトルを示している。

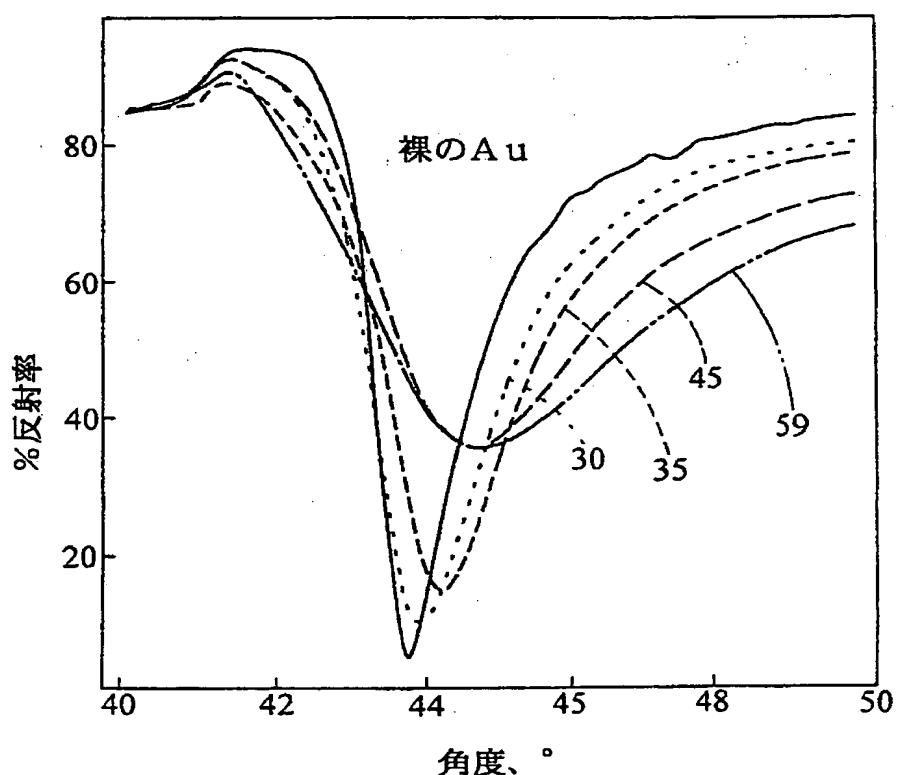
【図17】 図17はPDMSマイクロウェルアレイの製作過程の構成要素を示している、左から右へ:(A)1インチ平方電気ブレッドボード“マスター”、(B)PDMSポスト“マスター”、および(C)電気ブレッドボードのPDMSウェルアレイレプリカ。構成要素は、無色PDMSから形成された特性を促進するため暗いバックグラウンドに対して置かれている。

【図18】 図18はP D M Sアレイの選択されたウェルにおけるプロモクレゾールブルーの時間経過写真を示している；（A）時間＝0、（B）時間＝30分、（C）時間＝60分、および（D）時間＝24時間。

【図1】



【図2】



【図3】

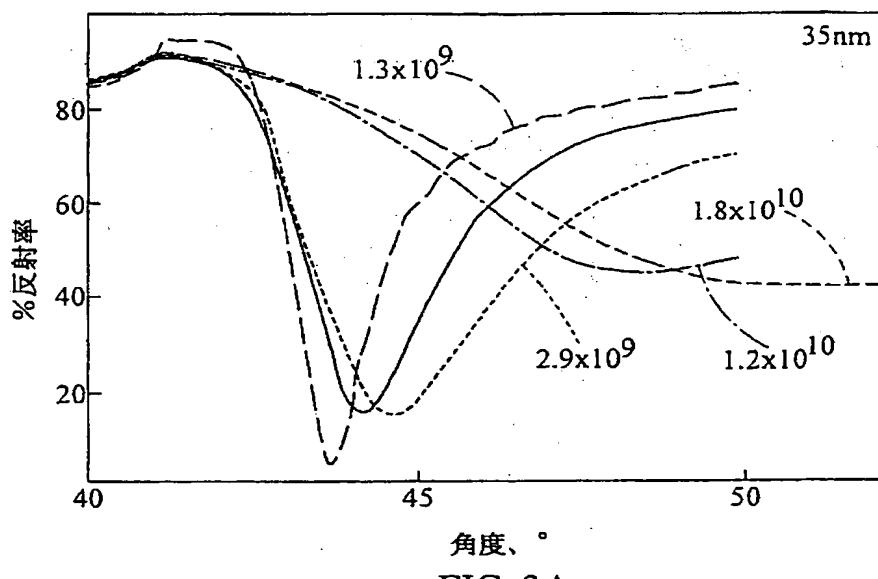


FIG. 3A

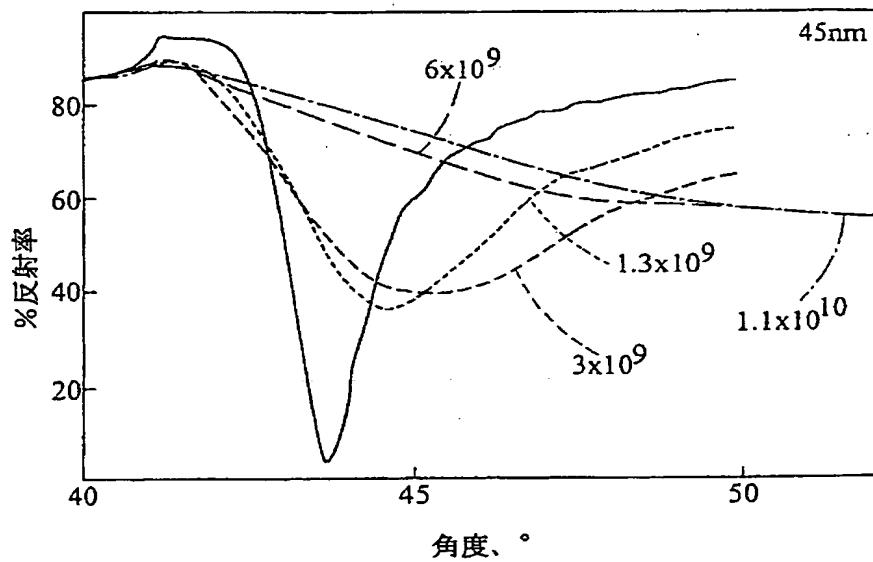


FIG. 3B

【図4】

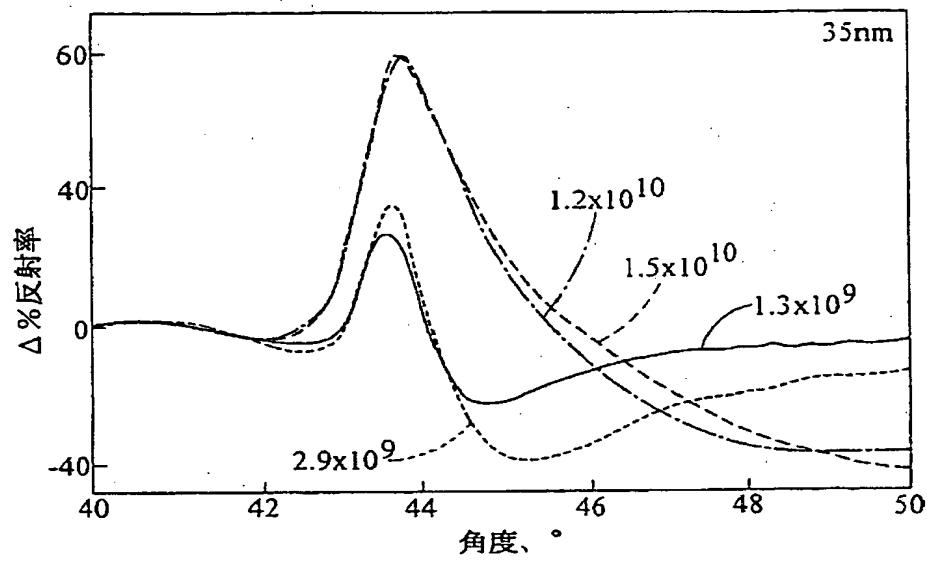


FIG. 4A

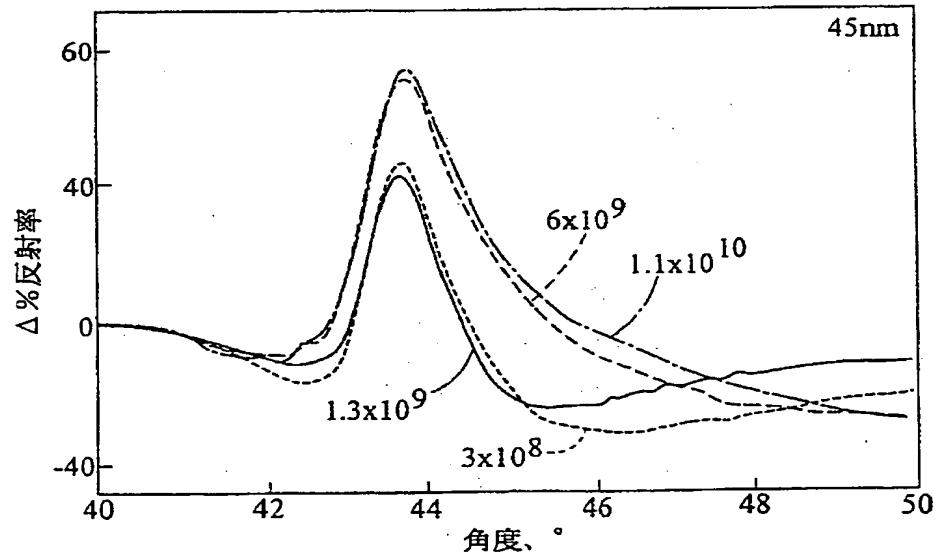
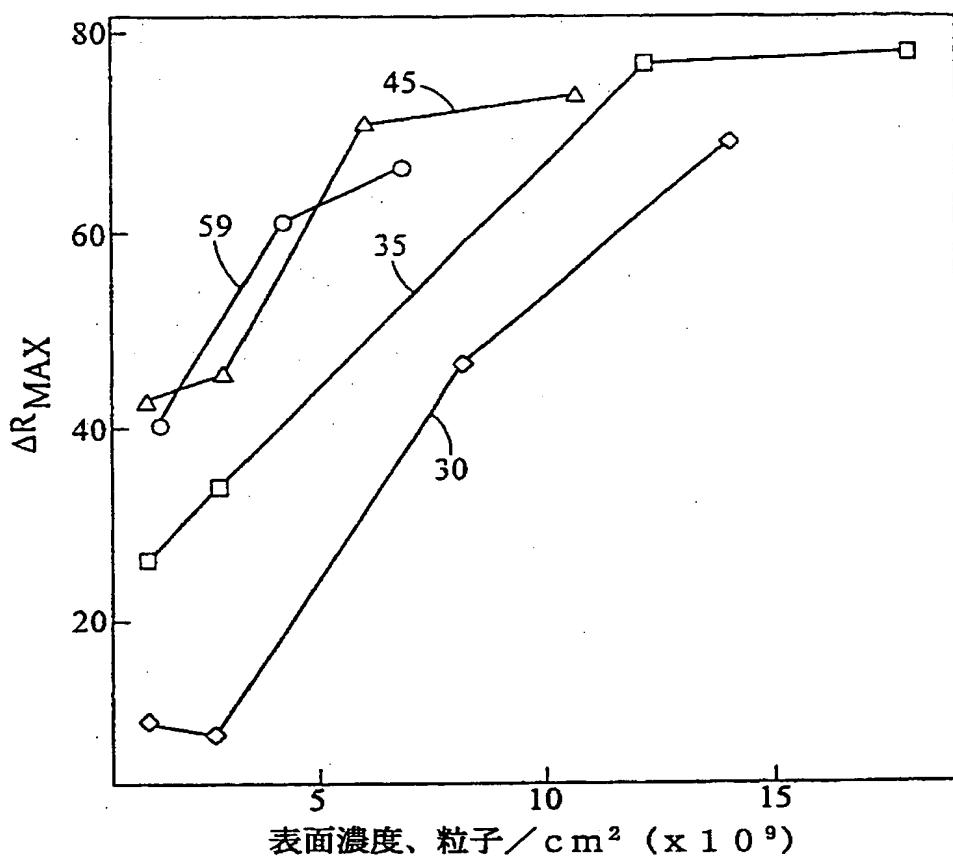
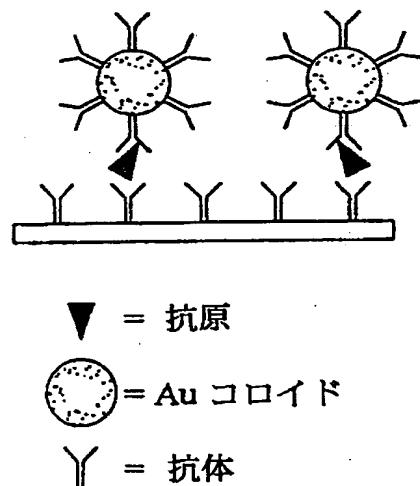


FIG. 4B

【図5】



【図6】



【図7】

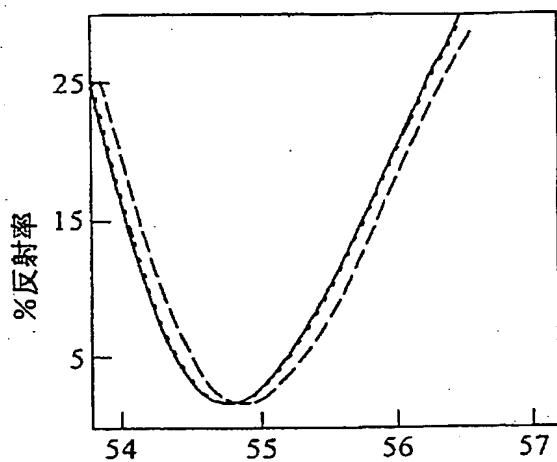


FIG. 7A

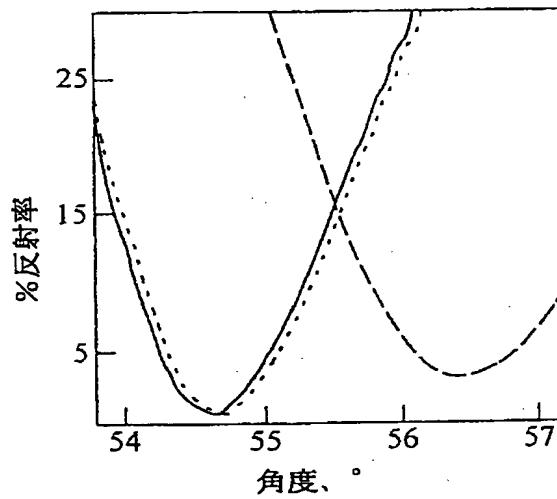
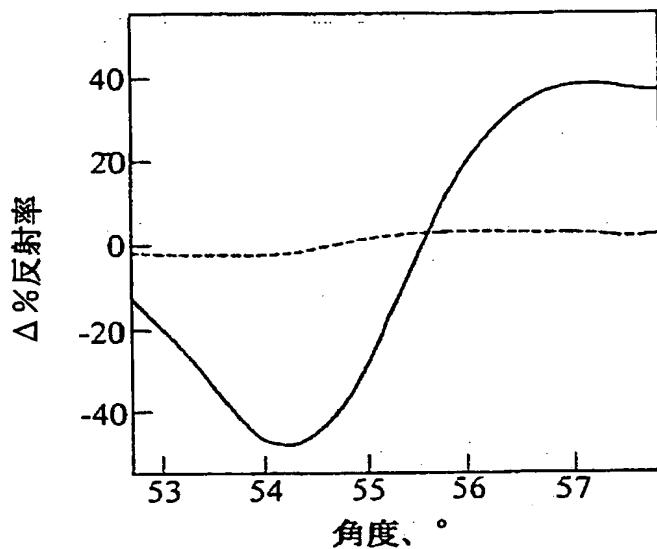
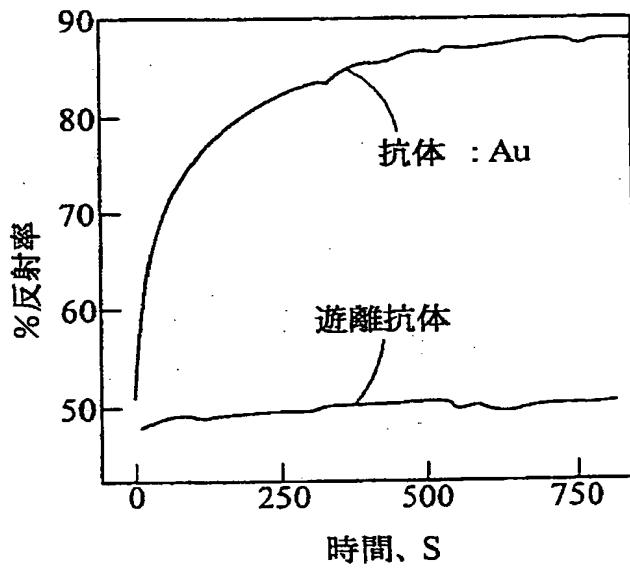


FIG. 7B

【図8】



【図9】



【図10】

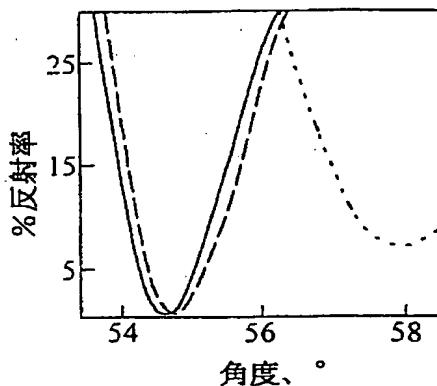


FIG. 10A

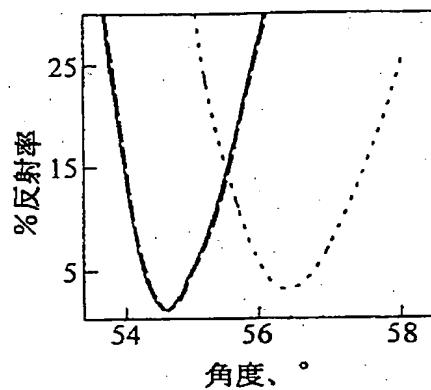


FIG. 10B

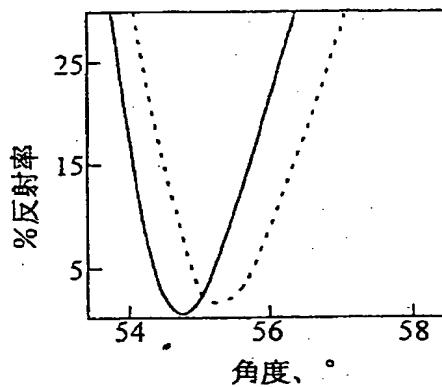


FIG. 10C

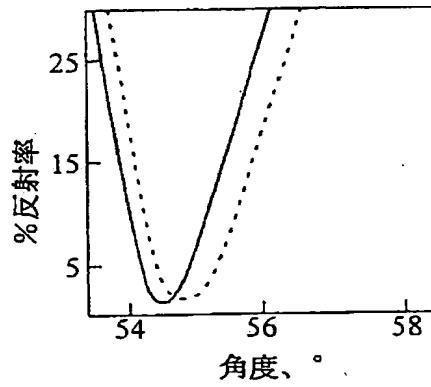


FIG. 10D

【図11】

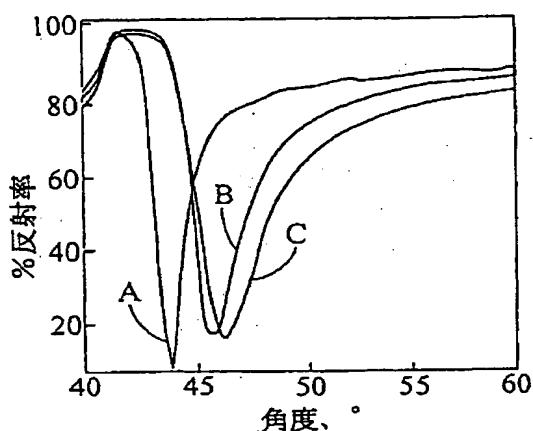


FIG. 11A

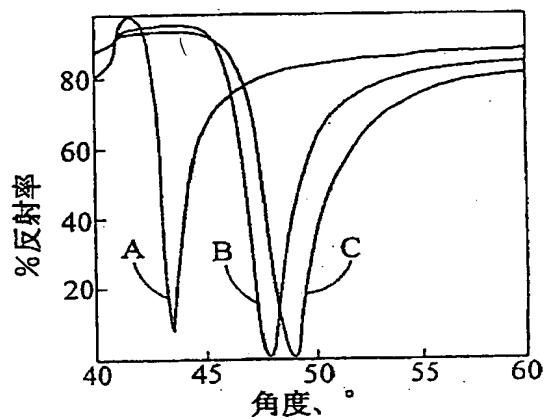


FIG. 11B

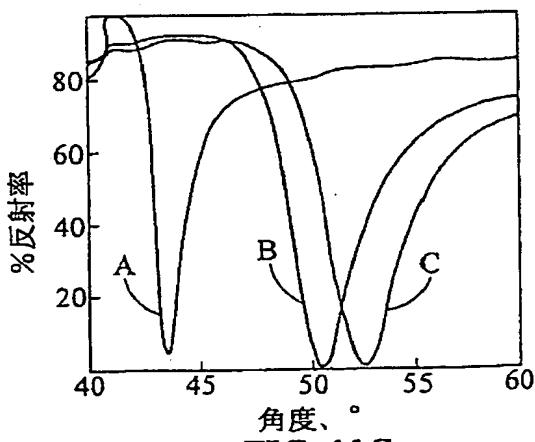
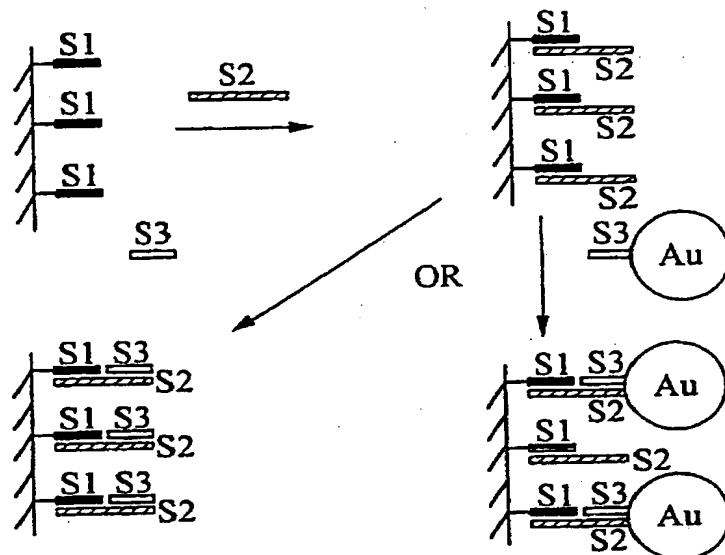


FIG. 11C

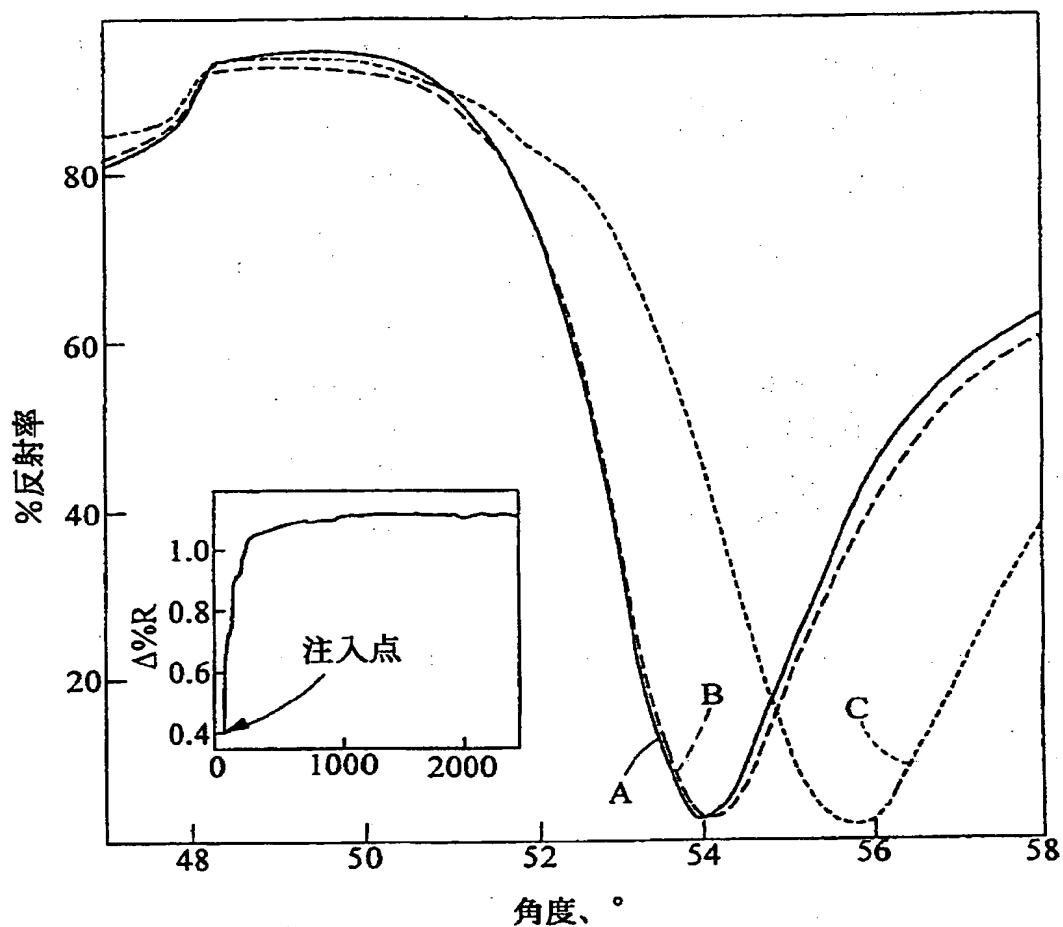
【図12】



増殖されなかった検出

増殖された検出

【図13】



【図14】

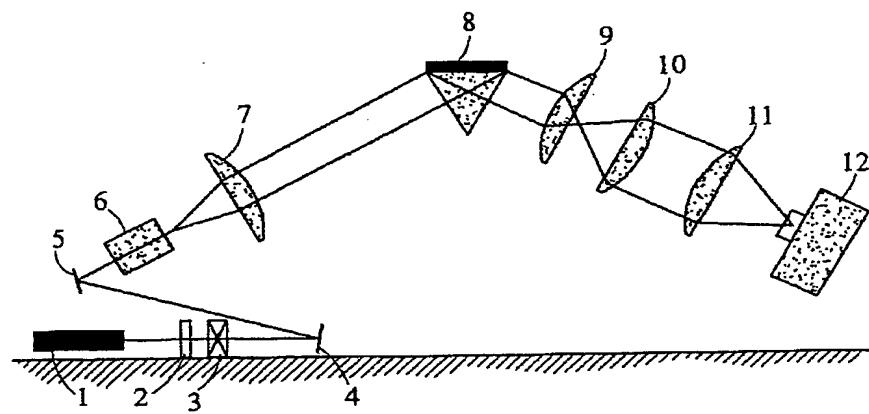


FIG. 14

【図15】

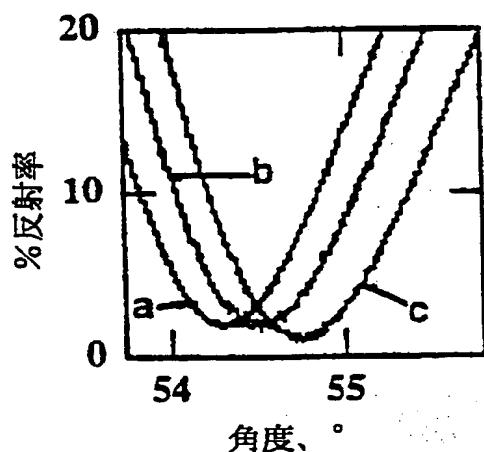


Fig. 15A

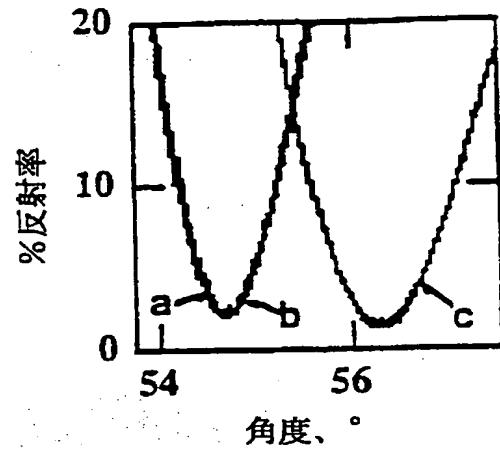
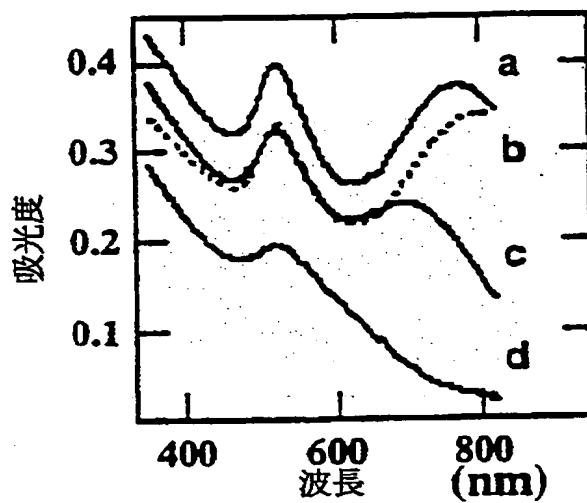


Fig. 15B

【図16】



【図17A】

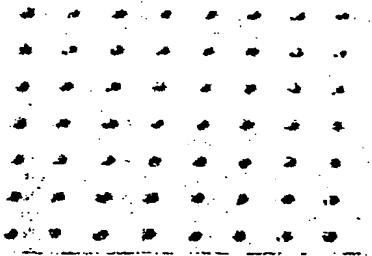


Fig. 17A

【図17B】

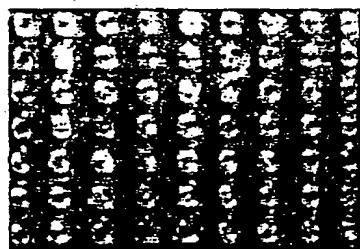


Fig. 17B

【図17C】

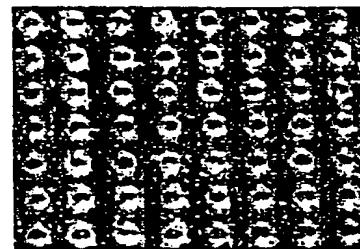


Fig. 17C

【図18A】

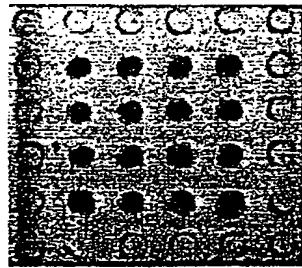


Fig. 18A

【図18B】

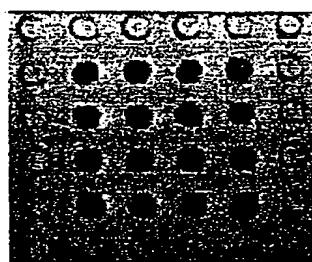


Fig. 18B

【図18C】

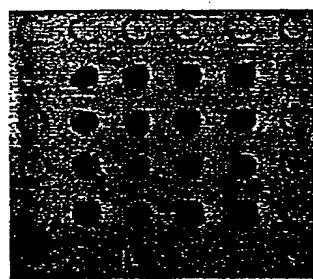


Fig. 18C

【図18D】

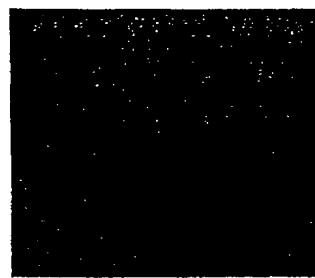
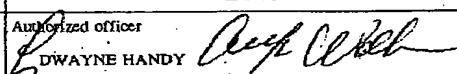


Fig. 18D

【国际調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No. PCT/US00/42139 |
|---|

| | | |
|---|--|-----------------------|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
| IPC(7) : G01N 21/65 US CL : 422/82.05, 102; 436/525, 164; 356/301 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 422/82.05, 102; 436/525, 164; 356/301 | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAST search terms microwell, PDMS, surface plasmon resonance, colloidal metal nanoparticle | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X,P | US 6,068,752 A (DUBROW et al) 30 May 2000, figs. 3-5, col. 6, lines 22-60. | 1,2 |
| Y | US 5,609,907 A (NATAN) 11 March 1997, entire document. | 12-18, 28-34 |
| X,E | US 6,149,868 A (NATAN et al) 21 November 2000, entire document. | 12-48 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| <p>* Special categories of cited documents:</p> <ul style="list-style-type: none"> *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *B* earlier document published on or after the international filing date document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *C* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *D* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *E* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *F* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *G* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *H* document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 03 APRIL 2001 | Date of mailing of the international search report 27 APR 2001 | |
| Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230 | Authorized officer  DWAYNE HANDY Telephone No. (703) 308-0661 | |

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | 識別記号 | F I | マーク(参考) |
|---------------|--|----------------|---------|
| G 0 1 N 21/33 | | G 0 1 N 33/543 | 5 9 5 |
| 33/543 | 5 9 5 | 37/00 | 1 0 3 |
| 37/00 | 1 0 3 | C 1 2 N 15/00 | F |
| (31)優先権主張番号 | 0 9 / 6 2 9 , 7 9 0 | | |
| (32)優先日 | 平成12年7月31日(2000. 7. 31) | | |
| (33)優先権主張国 | 米国 (U.S.) | | |
| (81)指定国 | EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF , BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, G M, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ , UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, B Z, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK , DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, J P, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR , LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, R O, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ , TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW) | | |
| (72)発明者 | グッドリッチ, グレン アメリカ合衆国ペンシルバニア州16801, ステイト・カレッジ, シェラーズ・ベンド 3181, ナンバー 5 | | |
| (72)発明者 | ヘ, リン アメリカ合衆国カリフォルニア州94087, サニーヴェイル, グランジャー・テラス 515, ユニット 3 | | |
| (72)発明者 | リオン, エル・アンドリュー アメリカ合衆国ジョージア州30066, マリ エッタ, ブルーザード・ウェイ 1675 | | |
| (72)発明者 | ムシク,マイケル・ディー アメリカ合衆国ペンシルバニア州, ハンテ ィンドン・ヴァレー, メドウブルック・ド ライブ 616 | | |
| (72)発明者 | ホリウェイ, ウィリアム・ディー アメリカ合衆国ジョージア州30308, アト ランタ, マートル・ストリート 848, ナ ンバー 10 | | |

F ターム(参考) 2G057 AA02 AB01 AB03 AB04 AB07
AC01 BA01 BA03 BB06
2G059 AA05 BB12 BB13 CC16 EE05
EE12 FF04 GG01 GG04 GG08
HH02 HH03 HH06 JJ01 JJ11
JJ12 JJ19 KK01 KK04 MM02
MM03
4B024 AA11 AA19 CA01 CA09 CA11
HA13 HA14
4B029 AA07 BB20 CC01 CC02 CC03
CC08 FA12 FA15
4B063 QA01 QQ42 QQ52 QR32 QR35
QR38 QR55 QR56 QR82 QS34
QS39 QX10

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.